

Aus dem Institut für Allgemeine Pathologie  
(Direktor: Prof. Dr. Christoph Röcken)  
des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel  
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

IMMUNHISTOCHEMISCHE STUDIE  
AN SOLID-PSEUDOPAPILLÄREN NEOPLASIEN DES PANKREAS IN HINBLICK AUF  
MOLEKULARGENETISCHE VERÄNDERUNGEN AUF DEM CHROMOSOM 11Q  
UND IM WNT-SIGNALWEG

Inauguraldissertation  
zur Erlangung der Würde des Doktors  
der Zahnheilkunde  
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von  
Astrid Grabau  
Kiel 2010

**1. Berichterstatter: PD Dr. Katharina Tiemann, Institut für Hämatopathologie**

**2. Berichterstatter: Prof. Dr. Leuschner, Institut für Pathologie**

**Tag der mündlichen Prüfung: 21. April 2011**

**Zum Druck genehmigt,**

**Kiel, den: 21. April 2011**

**gez.: Prof. Dr. Klapper, Institut für Pathologie  
(Vorsitzender der Prüfungskommission)**

## Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
2. Material und Methodik	4
2.1 Untersuchungsgut	4
2.2 Materialaufbereitung	4
2.2.1 Tissue-Microarrays©	4
2.2.2 Herstellung der Tissue-Microarrays©	5
2.2.3 Vorbehandlung der Schnitte	5
2.3 EnVision-Methode	7
2.3.1 Durchführung der EnVision-Methode	8
2.4 Kontrollgewebe	8
2.5 Immunhistochemische Auswertung	8
2.6 Datenverwaltung und statistische Auswertung	9
3. Ergebnisse	10
Graphik 1:	
Immunreaktiver Score der Marker in den SPN	13
Graphik 2:	
Markerexpression in den SPN	14
Graphik 3:	
Expressionshöhe der Marker in den SPN	15
Graphik 4:	
Abhängigkeit der Inzidenz der SPN vom Alter	16
Graphik 5:	
Altersabhängigkeit der Inzidenz der SPN nach Geschlecht	17
Graphik 6:	
Anteile der Marker an der Expressionshäufigkeit	18
Graphik 7:	
Markerexpression in Abhängigkeit vom Alter in SPN	19

Graphik 7.1:	
Markerexpression von p21 in Abhängigkeit vom Alter	20
Graphik 7.2:	
Häufigkeit der p21-Expression in Abhängigkeit vom Alter	21
Graphik 8:	
Abhängigkeit der Größe der SPN von der Expressionshöhe	22
4. Diskussion	23
5. Zusammenfassung	29
6. Literaturverzeichnis	30
7. Anhang	33
8. Danksagung	49
9. Lebenslauf	50

## Abkürzungsverzeichnis

SPN: solide pseudopapilläre Neoplasie  
NET: neuroendokrine Tumoren des Pankreas  
CDK: Cyclin-abhängige Kinasen  
pRb: Retinoblastom  
TMA: Tissue Micro-Arrayer  
IRS: immunreaktiver Score  
AK: Antikörper  
Lj.: Lebensjahr  
SHBG: Sex Hormone Binding Globuline  
pos.: positiv  
neg.: negativ  
k.A.: keine Angaben  
fortl.Nr.: fortlaufende Nummer  
Std.Abweichung: Standardabweichung

## 1. Einleitung

Nach der Tumorklassifikation der World Health Organisation (WHO) der Vereinten Nationen ist die solid-pseudopapilläre Neoplasie (SPN) des Pankreas eine seltene, meist benigne Neoplasie des exokrinen Pankreas mit niedrig maligner Potenz.<sup>1</sup> Von allen exokrinen Tumoren machen die, meist solitär auftretenden, SPN nur 1-2% aus und sind damit eine Rarität.<sup>2,3</sup> Die genaue Inzidenz ist unklar, da die SPN oft nicht erkannt werden.<sup>2</sup> Sie werden oft zufällig entdeckt, da sie lange asymptomatisch bleiben und erst ab einer gewissen Größe uncharakteristische abdominale Beschwerden hervorrufen können, die mit Übelkeit, Erbrechen und Bauchschmerz einhergehen.<sup>4</sup> Diese Tumoren sind zumeist rund, groß (die Größenspanne liegt bei 1-17cm bei einem Durchschnitt von 7cm) und können in jedem Abschnitt des Pankreas vorgefunden werden. Zudem können sie dem Pankreas anhängen oder extrapankreatisch zu finden sein. In sehr raren Fällen wachsen sie lokal infiltrierend und bilden Metastasen aus.<sup>4</sup> Obgleich die SPN recht groß werden können, weisen sie meist eine gute Prognose auf.<sup>5,6</sup> Voraussetzung hierfür ist allerdings, dass sie vollständig entfernt werden.<sup>6,7,8</sup>

Es ist immer noch ungeklärt, warum diese Neoplasie speziell junge Frauen betrifft und wieso maligne Entartungen eine Rarität darstellen. Antworten suchte man unter anderem über die Herkunft, also über die Ursprungszellen oder das Ursprungsgewebe, der SPN zu erlangen. Doch blieben diese Untersuchungen bislang erfolglos, da Zellen der SPN weder pankreatischem noch extrapankreatischem Gewebe zugeordnet werden konnten. Auch ein vaskulärer,<sup>9</sup> azinärer,<sup>6,10,11,12,13</sup> und neuroendokriner,<sup>14,15,16,17</sup> Ursprung konnte bisher ausgeschlossen werden. Als die wahrscheinlichere Möglichkeit wird ein Ursprung aus pluripotenten oder transdifferenzierten Zellen erachtet, da c-kit, das unter anderem eine Rolle bei der Regeneration von  $\beta$ -Zellen im Pankreas spielt,<sup>18</sup> auch in den SPN zu finden ist.<sup>9</sup>

Erstmals beschrieben wurden diese Neoplasien als papilläre Tumoren im Jahre 1959 von Virginia Frantz.<sup>19</sup> Wobei sie zuweilen als solid-zystische, solid-papilläre und epitheliale Tumoren klassifiziert wurden.<sup>6,7,8,20</sup> Noch heute werden sie als rein epitheliale Neoplasien angesehen und zu den zystischen Pankreastumoren gezählt.<sup>1</sup> Histologisch können neben hämorrhagisch-pseudozystischen Komponenten, solide und pseudopapilläre Strukturen vorliegen. Man vermutet, dass die Pseudopapillen ihren Ursprung in einer Mutation des Exon 3 des  $\beta$ -Catenin Gens auf Chromosom 3 haben,<sup>4</sup> das den Tumorzellen die Fähigkeit zur Adhäsion untereinander nimmt und zu einer konsistenten Überexprimierung von Cyclin D<sub>1</sub> in den SPN führt.<sup>9</sup> Diese Veränderung wurde in 83-90% der Tumoren vorgefunden.<sup>21,22</sup> Dies erschien jedoch rätselhaft, da diese Neoplasien selten maligne sind und Cyclin D<sub>1</sub> in der Regel mit der Progression verschiedener Karzinome in Verbindung steht.<sup>23,24</sup> Dies schließt normalerweise eine erhöhte Proliferationsaktivität und schlechte Prognose mit ein.<sup>31</sup> Die SPN

wachsen dagegen langsam und besitzen nach ausreichender Resektion eine exzellente Prognose.<sup>6,7,8</sup> Dabei ist die vollständige kurative Resektion von großer Bedeutung, da bisher weder histologisch noch biologisch die Möglichkeit zur Unterscheidung von benignen und malignen SPN besteht.<sup>4</sup>

Aufgrund der Gutartigkeit und niedrigen Proliferationsrate dieser Neoplasie muss davon ausgegangen werden, dass der von Cyclin D<sub>1</sub> und CDK<sub>4</sub> aktivierte Wnt-Signalweg unterbrochen wurde und in einer Hemmung der Zellzyklusaktivität resultierte. Dieser Frage sind wir nachgegangen, indem wir die Expression von Cyclin D<sub>1</sub> und die Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren p16, p21 und p27 in der vorliegenden Arbeit untersucht haben. In den Zellkernen der SPN finden sich als Ausdruck starker immunhistochemischer Positivität das  $\beta$ -Catenin, der Progesteron-Rezeptor, Cyclin D<sub>1</sub>,<sup>25,4</sup> p27, p21 und schwach p16. Es ist bekannt, dass sich die Gene der Proteine ATM, Fli-1, CD56, Cyclin D<sub>1</sub> und des Progesteron-Rezeptors auf dem langen Arm des Chromosoms 11 befinden. Die Gene für den Progesteron-Rezeptor liegen auf 11q22, für CD56 und ATM (Ataxia teleangiectasia mutated) auf 11q23, für Fli-1 auf 11q24 und für Cyclin D<sub>1</sub> auf 11q13. Die auffällige Häufung dieser Marker im Zellkern macht eine Translokation oder Mutation in dem Bereich denkbar oder eine Aktivierung auf dem Wege der Transkription.<sup>9</sup> Da ATM ebenfalls auf dem Chromosom 11 lokalisiert ist, haben wir es in unsere Untersuchungen miteinbezogen. Es ist ein Protein, das DNA-Schäden registriert und entsprechende Signale an den Tumorsuppressor p53 weiterleitet.<sup>26</sup>

Uns interessierte insbesondere, woraus sich das benigne Verhalten und das langsame Wachstum der SPN ergeben und in welcher Form der aktivierte Wnt/Signal-Weg beeinflusst wird. Darüber hinaus war es uns ein Anliegen die Signifikanz des Chromosoms 11q näher zu erörtern. Zur Verwirklichung dieses Vorhabens lag uns in Anbetracht des seltenen Vorkommens dieser Neoplasie eine mit 88 Fällen vergleichsweise große Anzahl an SPN vor.

### **Fragestellungen**

1. Lässt sich aus dem Markerprofil erkennen, weshalb und welche SPN des Pankreas meist gutartig sind?
2. Warum ist die Proliferationsrate der SPN so niedrig, obwohl das Zellzyklus-assoziierte Protein Cyclin D<sub>1</sub> stark exprimiert ist?
3. Welchen Einfluss hat das Alter der Betroffenen auf die Inzidenz der Neoplasie und auf die Markerexpression? Unterscheidet sich die Altersverteilung zwischen weiblichen und männlichen Patienten mit SPN des Pankreas?

## **2. Material und Methodik**

### **2.1 Untersuchungsgut**

Das hier untersuchte Probenmaterial entstammte dem Konsiliararchiv des Instituts für Pathologie der Universität Kiel sowie dem Kindertumorarchiv der Sektion für Paidopathologie der Universität Kiel. Es lagen 88 Patientenfälle mit SPN aus den Jahren 1979 bis 2006 vor, davon waren zwei Fälle weiblicher Herkunft maligne. 69 Fälle (88,5%) waren weiblichen und 9 Fälle (11,5%) männlichen Ursprungs. Das Durchschnittsalter betrug 31 Jahre. Die Altersspanne der Patienten zur Operationszeit belief sich auf 11 bis 71 Jahre.

Pro Patient mit SPN lagen 3 bis 5 Paraffinblöcke formalinfixierten Gewebes vor.

### **2.2 Materialaufbereitung**

Für die Färbung wurden Schnitte von ca. 3 µm Stärke unter Einsatz eines Rotationsmikrotoms (Leica RM2145) angefertigt. Hierbei handelte es sich um Paraffinblöcke mit in Formalin fixierten Geweben, die auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger, Menzel, Deutschland) aufgezogen wurden. Danach wurden sie über Nacht bei 37° Celsius im Brutschrank (Memmert, Schwabach, Deutschland) getrocknet.

#### **2.2.1 Tissue-Microarrays©**

Um effektiver und weniger kostenintensiv zu arbeiten, bediente man sich einer in den 1990er Jahren entstandenen Technologie, den so genannten Tissue-Microarrays© (TMA). Mittels dieser Methode wird insgesamt weniger Material in der Immunhistochemie verwendet. Es können in nur einem Arbeitsschritt unter identischen Experimentbedingungen große Mengen an Proben zugleich behandelt werden. In diesem Fall wurden beispielsweise durch einmalige Applikation eines Antikörpers (AK) oder eines Chromogens zeitgleich bis zu 60 verschiedene Proben erreicht, die alle den gleichen Markierungsbedingungen derselben AK-Charge unterlagen. Ein weiterer Vorteil ist der vergleichsweise geringe Verbrauch der Probenmenge, so dass wertvolles Gewebe auch noch in der Zukunft für Forschungszwecke genutzt werden kann. Zudem ist ein übersichtlicher Vergleich der verschiedenen nebeneinander aufgereihten Proben auf einem Objektträger möglich.

Um zu vermeiden, dass wichtige Bereiche der Gewebe außer Acht gelassen werden und/oder, dass nur ein nicht-repräsentativer Bereich aus dem Gewebe zur Probenherstellung gewonnen und untersucht wird, wurden zwei bis vier als repräsentativ klassifizierte Bereiche aus den einzelnen Neoplasien herausgesucht und auf die Micro-Arrays gebracht.



### **2.2.2 Herstellung der Tissue-Microarrays©**

Zunächst wurden repräsentative Tumorbereiche aus Hämatoxylin-Eosin (H.E.)-gefärbten Schnitten ausgewählt und markiert. Mittels des manuell zu bedienenden Tissue-Arrayers wurden in einen leeren Paraffinblock in 6 Reihen 60 zylinderförmige Löcher gestanzt. Diese Hohlräume waren geringfügig kleiner als die darin später eingebrachten Gewebeproben, um einen besseren Halt und Verbund gewährleisten zu können. Im nächsten Schritt wurde eine größere Stanze in Position gebracht und der Donor-Paraffinblock mit dem zu untersuchenden Gewebe in den Halter des Gerätes gespannt, wobei die Stellschrauben so angezogen wurden, dass der Block nicht verrutschen konnte. Um einen Gewebe-Arrayer herstellen zu können, wurden Donor-Blöcke mit einer Mindeststärke von 1 mm hergestellt. Der dazugehörige H.E.-Schnitt wurde auf den Donor-Block gelegt, um die zuvor auf dem Objektglas des H.E.-Schnittes markierte Position im Block auffinden und mit dem größeren Zylinder herausstanzen zu können. Damit sich Gewebe und Paraffinwand nachhaltig vereinigen konnten, wurden sie danach für ca. 15 Minuten im Brutschrank bei 37°C erwärmt. In Abhängigkeit von der Schichtstärke der Gewebe könnten aus solchen Blöcken nach Herstellerangaben 150 bis 300 Schnitte angefertigt werden. Für die AK-Färbungen dieser Studie genügten 5 Schnitte pro Block, da nur Färbungen für die oben genannten 5 Marker durchgeführt werden sollten.

Es wurden 3 µm dünne Lagen geschnitten und auf beschichtete Objektträger (SuperFrost Plus Objektträger, Menzel, Deutschland) aufgezogen. Diese runden Leerschnitte besaßen einen Durchmesser von ca. 1,7mm. Auf diese Art wurden bis zu 60 Tumorproben nebeneinander auf einen Objektträger gebracht und zur Identifizierung und leichteren Orientierung mit einem Koordinatensystem versehen.

Insgesamt lagen uns nach dieser Prozedur 25 Schnitte von 5 Blöcken mit je ca. 60 Proben vor. Nun konnte durch die einmalige Applikation eines AK eine immunhistochemische Färbung von bis zu 60 SPN zugleich erfolgen.

### 2.2.3 Vorbehandlung der Schnitte

Vorab mussten die Schnitte entparaffiniert und rehydriert werden. Bewerkstelligt wurde dies, indem sie 2 Mal für 15 Minuten in 100%iges Ethanol mit Xylol gestellt wurden und daraufhin in einer absteigenden Alkoholreihe von 100%igem Ethanol über 96%iges bis zu 70%igen Ethanol geführt und anschließend in Aqua dest. gespült wurden.

Da die Antigene der Proben durch die Formalin-Fixierung maskiert waren, wurde folgendermaßen vorgegangen: Zur Demaskierung wurden die Schnitte in Küvetten verteilt und in einen Autoklaven (Firma DAKO, Pascal S2801) mit 500 ml Aqua dest. und TEC-Stammlösung überführt. Dieser Tris-EDTA-Puffer (10X) wurde in 1Liter Aqua dest. angesetzt: 2,5 g TRIS-Base, 5 g EDTA (Titriplex III®), 3,2 g Tri-Natrium Citrat-Dihydrat. Die Stammlösung wurde mit Citratpuffer auf pH 7,8 eingestellt.

Leere Objektträger wurden hinzugefügt, damit die Küvetten randvoll waren und dadurch ein immer gleicher, reproduzierbarer Flüssigkeitsstand im Autoklaven vorhanden war. Die Überprüfung der Funktionsfähigkeit dieses Autoklaven erfolgte während der Durchführung der Versuchsreihe wöchentlich mit Hilfe eines datierbaren Kontrollstrips (Firma DAKO, Pascal Quality Strips S2801), der sich braun färbt, wenn Druck und Temperatur im Autoklaven die gewünschten Werte erreichen. Binnen einer Stunde wärmte sich der Topf von Raumtemperatur bis 125° Celsius hoch und verweilte dort eine Minute bei einem Druck von 21 psi.

Um nicht ein falsch positives Ergebnis nach Umsetzen des Chromogens durch ubiquitär in Gewebe vorhandene endogene Peroxidase zu erhalten, musste diese vor dem Färben blockiert werden. Um dies zu erreichen, wurden die Schnitte dieses Mal in aufsteigender Folge durch die Alkoholreihe von 70%igem bis 96%igem Ethanol geführt und dann für 15 Minuten in methanolischem H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (4 ml Perhydrol® in 200 ml Methanol) inkubiert. Perhydrol® ist 30%iges H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Es handelt sich hierbei um das Substrat der Peroxidase und bewirkt, im Überschuss zugegeben, den Verbrauch des endogenen Enzyms.

Nun wurden die Schnitte wiederholt durch die absteigende Alkoholreihe geführt und sodann unter Aqua dest. abgespült. Anschließend wurden die Küvetten wieder mit den Schnitten bestückt und in Waschpuffer gewaschen. Der Waschpuffer setzte sich wie folgt zusammen: 9 g TRIS Base, 68,5 g TRIS-HCL und 87,8 g NaCl ad 10L Aq.dest. aufgefüllt.

### 2.3 EnVision-Methode

Unter Zuhilfenahme der EnVision-Methode wurden mit folgenden Antikörpern immunhistochemische Färbungen von den entsprechenden Antigenen ausgeführt:

Tabelle 1:

monoklonale Antikörper	Spezifität	Verdünnung	Hersteller
p16 INK4a Ab-7 (aus der Maus)	p16	1:50	NeoMarkers, Inc, Fremont, CA, USA
WAF1 Protein NCL-L-WAF-1 (aus der Maus)	p21	1:10	Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK
Anti-Human p27 Kip1 (aus der Maus)	p27	1:50	DakoCytomation Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
Clone SP4 (aus dem Kaninchen)	Cyclin D <sub>1</sub>	1:10	NeoMarkers, Inc, Fremont, CA, USA
Monoclonal Antibody to ATM (aus der Maus)	ATM	1:10	Acris Antibodies GmbH, Hiddenhausen, Deutschland

Die EnVision-Methode ist ein Zwei-Schritt-Detektionssystem von Antigenen, das von der Firma DAKO (Hamburg, Deutschland) entwickelt wurde. Diese so genannte indirekte Methode ist der herkömmlichen 3-Schritt-Avidin-Biotin-Methode in sofern überlegen, als sie einfacher, ökonomischer, sensitiver und rascher durchgeführt werden kann, da eine Färbung in zwei statt drei Schritten möglich ist. Das Prinzip bei beiden Methoden beruht darauf, einen Sekundär-Antikörper an einen Primär-Antikörper zu binden, der an sein spezifisches Antigen gebunden ist. Um das gesuchte Antigen indirekt sichtbar zu machen, wird ein Chromogen verwendet (hier: DAB als Elektronendonator), dass von einem an den Sekundärantikörper gekoppelten Enzym unter Anwesenheit des Katalysators  $H_2O_2$  in einen Farbstoff umgesetzt wird. Grundlage für die höhere Sensitivität der EnVision-Methode ist die hohe Anzahl an Enzymmolekülen (hier: Peroxidase), die zusammen mit Sekundär-Antikörpern (hier: monoklonale Anti-Maus) an ein gemeinsames fadenförmiges Trägermolekül (Dextran) gebunden sind. Es handelt sich hierbei um das gebrauchsfertige Polymerkonjugat DAKO EnVision+™, Peroxidase, Mouse bzw. Rabbit (DAKO, Carpinteria, USA).

### **2.3.1 Durchführung der EnVision-Methode**

Nach vorsichtiger Entfernung des überschüssigen Tris-Puffers von den Schnitten wurde der Primär-Antikörper in DAKO-Verdünnungslösung (DAKO Antibody Diluent with Background Reducing Components, Tris-HCL, Carrier Proteins, 15 mM NaN<sub>3</sub>; DAKO, Carpinteria, USA) aufgebracht.

Das nach Austestung errechnete Volumen von 150 µl pro Schnitt, wurde auf die Proben pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 40 Minuten wurde der Überschuss der Primär-Antikörper-Lösung drei Mal mit Waschpuffer abgespült und dadurch die Reaktion gestoppt. Alsdann wurde der oben angegebene Polymer-Sekundär-Antikörper-Enzym-Komplex zur Bindung des primären Maus-Antikörpers hinzugefügt, 30 Minuten inkubiert, gefolgt von einer dreimaligen Spülung mit TRIS-Puffer. Als nächstes wurden drei Tropfen (entsprechen 150 µl) des Chromogens DAB Substrate Peroxidase Kit (3,3'-Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid mit Nickel-Cobalt-Verstärkung; Vector Laboratories, Burlingame, USA) auf die Schnitte gebracht, zehn Minuten inkubiert und drei Mal mit Aqua dest. gespült. Um nicht gefärbte Zellen im Gewebe als Kontrast sichtbar zu machen, wurde sodann für eine Minute eine Kerngegenfärbung, so genanntes Bläuen, mit Hämalun (Firma Merck) unter fließendem Wasser vollzogen bis sich das Spülwasser klar darstellte. Dabei lieferte das Leitungswasser die für den Prozess erforderlichen Ionen. Die positive Reaktion der Kerne resultierte in einer Blaufärbung derselben. Zur Dehydrierung wurden die Schnitte im weiteren Verlauf aus dem wässrigen Milieu über die aufsteigende Alkoholreihe bis zum 100%igen Ethanol mit Xylol geführt. Zuletzt wurden die Schnitte mit Pertex® (Eindeckungsmittel/Klebstoff zwischen Deckgläschen und Objektträger; enthält Xylol und Ethylbenzol; Firma Medite) durch Eindecken haltbar gemacht.

### **2.4 Kontrollgewebe**

Neben den SPN-Proben wurden jedem Array als Vergleichsgewebe je 2 Tonsillen-Gewebe (Negativ-Kontrolle), je zwei unveränderte Pankreas-Gewebe (zusätzliche Negativ-Kontrolle) und je ein Kolonkarzinom (Positiv-Kontrolle) hinzugefügt.

### **2.5 Immunhistochemische Auswertung**

Die Auswertung erfolgte quantitativ in Form einer Auszählung der angefärbten Zellkerne der SPN unter Zuhilfenahme des Mikroskops Axioskop 50 (Zeiss, Deutschland). Diese Zählung wurde von zwei Untersuchern ausgeführt. Als positiv gewertet wurden die Reaktionen der Zellkerne auf die verschiedenen Antikörper, wenn mindestens 5% der Zellkerne eine

Färbung aufweisen konnten. Wurde das verwendete Chromogen nicht umgesetzt, wurde dies als negative AK-Reaktion mit 0% bewertet. Bei der Zählung ist man, abgesehen von zwei Ausnahmen, in 5% Schritten vorgegangen. Zu den Ausnahmen gehörte der Bereich unter 5%, der der Genauigkeit halber noch in 0% und 2% unterteilt wurde. Für den Bereich, in dem annähernd 100% der Kerne gefärbt erschienen, einigte man sich auf die Angabe von 98%.

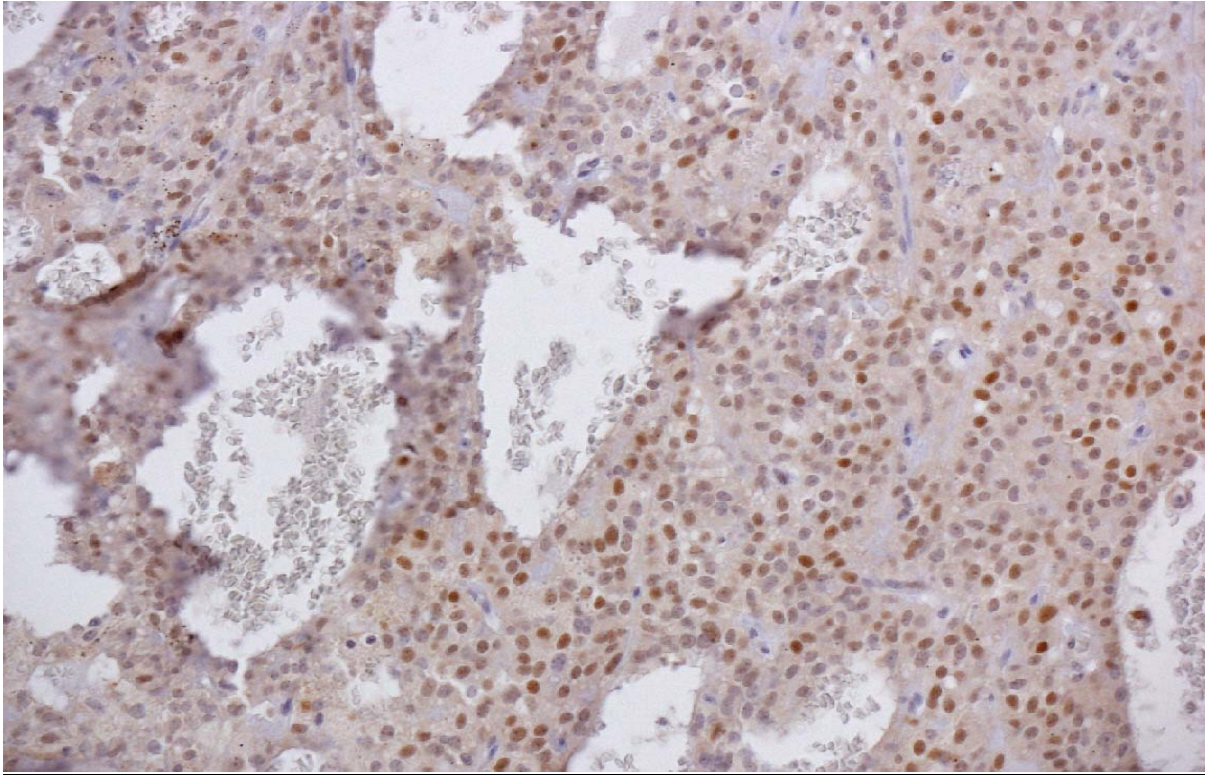
## **2.6 Datenverwaltung und statistische Auswertung**

Die Daten wurden mittels des Excel Programms verwaltet und mithilfe des Statistik Programms SPSS© 15.0 ausgewertet. Mittelwerte, Standardabweichungen, Minima, Maxima und Perzentile wurden als deskriptive Statistik für die durchschnittliche Gesamtverteilung des Patientenalters und die Expressionshöhe der verschiedenen Marker angegeben. Zur Beurteilung statistischer Signifikanz kamen unterschiedliche Tests zum Einsatz. Um vermeintlich signifikante Übereinstimmungen der Expressionshöhe der Marker untereinander zu prüfen, machte man sich den Test nach Spearman-rho zu nutze. Korrelationen der Marker untereinander bezüglich der Intensität der Expression wurden mit dem Kendall-Tau-b-Test belegt. Für die Beurteilung eines Zusammenhanges zwischen der Markerintensität und der Expressionsmenge, eines Zusammenhanges zwischen der Expressionshöhe und den einzelnen Altersklassen sowie der Expressionshöhe und der Tumorgroße wurde der Kruskal-Wallis-Test zugrunde gelegt. Der Chi-Quadrat-Test nach Pearson wurde eingesetzt, um zu prüfen, ob eine Wechselbeziehung zwischen Patientenalter und positiver AK-Reaktion der einzelnen Marker besteht sowie zwischen Patientenalter und Inzidenz der SPN. Als signifikant eingestuft wurden Zusammenhänge mit einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  und Resultate mit  $p < 0,01$  als hochsignifikant.

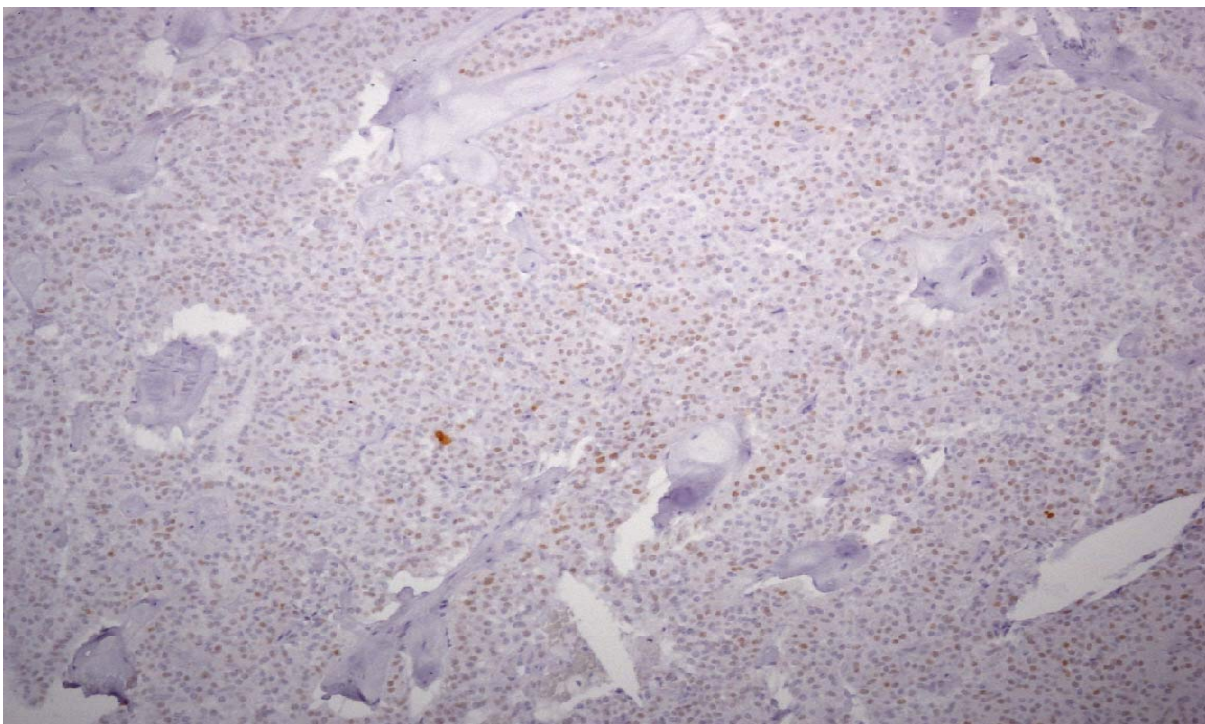
### 3. Ergebnisse

Insgesamt lag uns eine Serie von 88 SPN vor. Davon waren 69 Fälle weiblichen und 9 Fälle männlichen Ursprungs. In 10 Fällen fehlten die Angaben des Geschlechts. Zwei SPN waren maligne. Es wurde folgende geschlechtsspezifische Verteilung für Patienten mit SPN vorgefunden: Frauen mit einer Häufigkeit von 88,5% und Männer mit 11,5%. Dies entspricht einem Verhältnis von 8:1. Anderen Veröffentlichungen ähnelnd <sup>21,22</sup> belief sich das Durchschnittsalter auf 30,7 Jahre.

Die vorliegende Untersuchung beschreibt das Verhalten der fünf Markerproteine p16, p21, p27, Cyclin D<sub>1</sub> und ATM in den Zellkernen der SPN. In Augenschein genommen wurde, wie oft es positive AK-Reaktionen der Marker gab, wie hoch in diesen Fällen die Expression war (0 bis 98%) und wie stark diese war. Letzteres, also die Intensität der Reaktion, wurde in 6 Schritten [- , + , +(+) , ++ , ++(+), +++] gemessen. 85% aller untersuchten Zellkerne der SPN wiesen positive immunhistochemische Reaktionen auf. Nur insgesamt ca. 15% reagierten nicht auf die eingesetzten Antikörper.

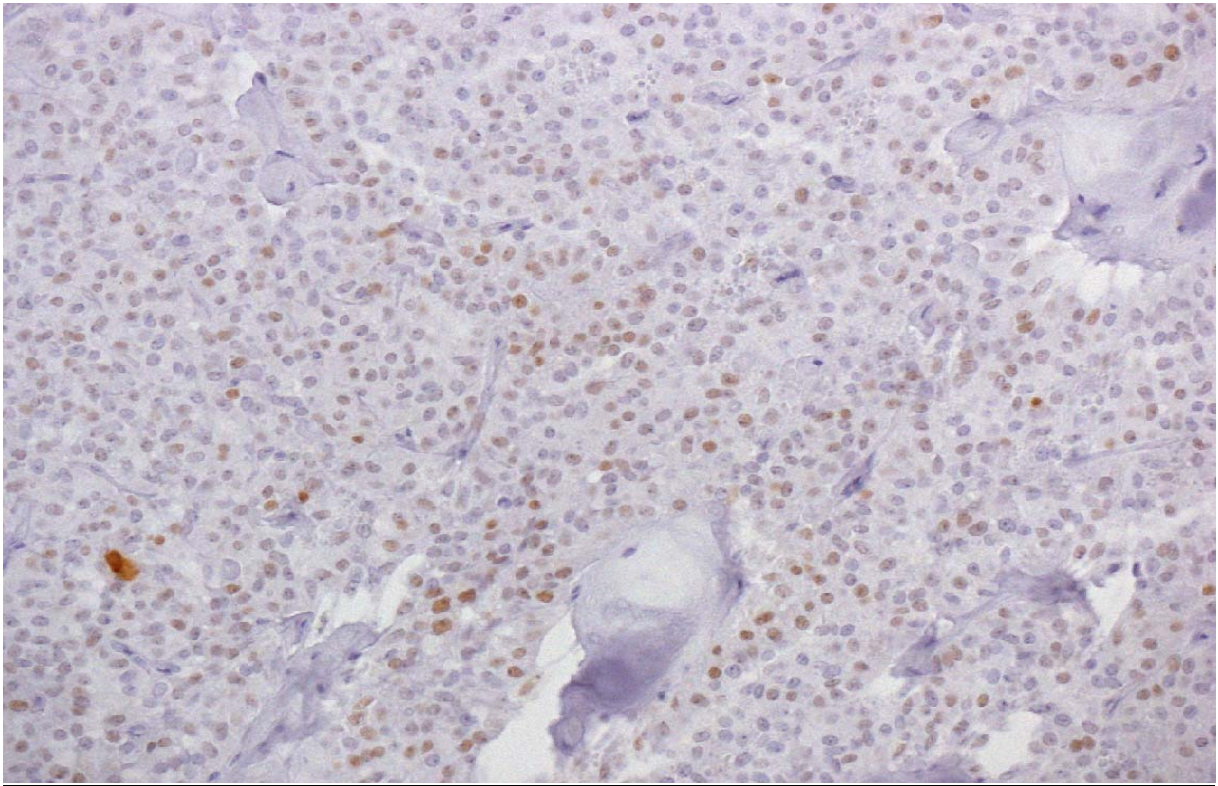
**Exemplarische immunhistochemische Abbildungen der SPN**

Nukleäre Expression von Cyclin D1 in SPN aus TMA 1 ( Originalvergrößerung 200x )

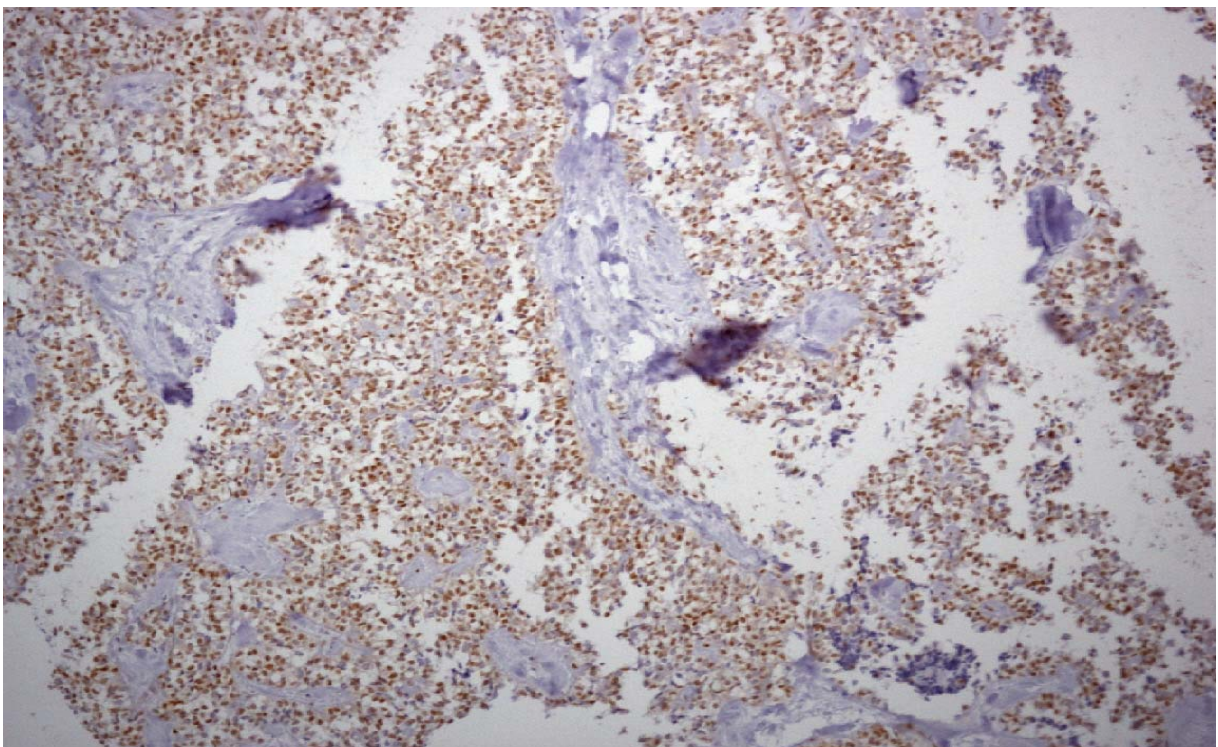


Nukleäre Expression von p21 in SPN aus TMA 1 ( Originalvergrößerung 100x )



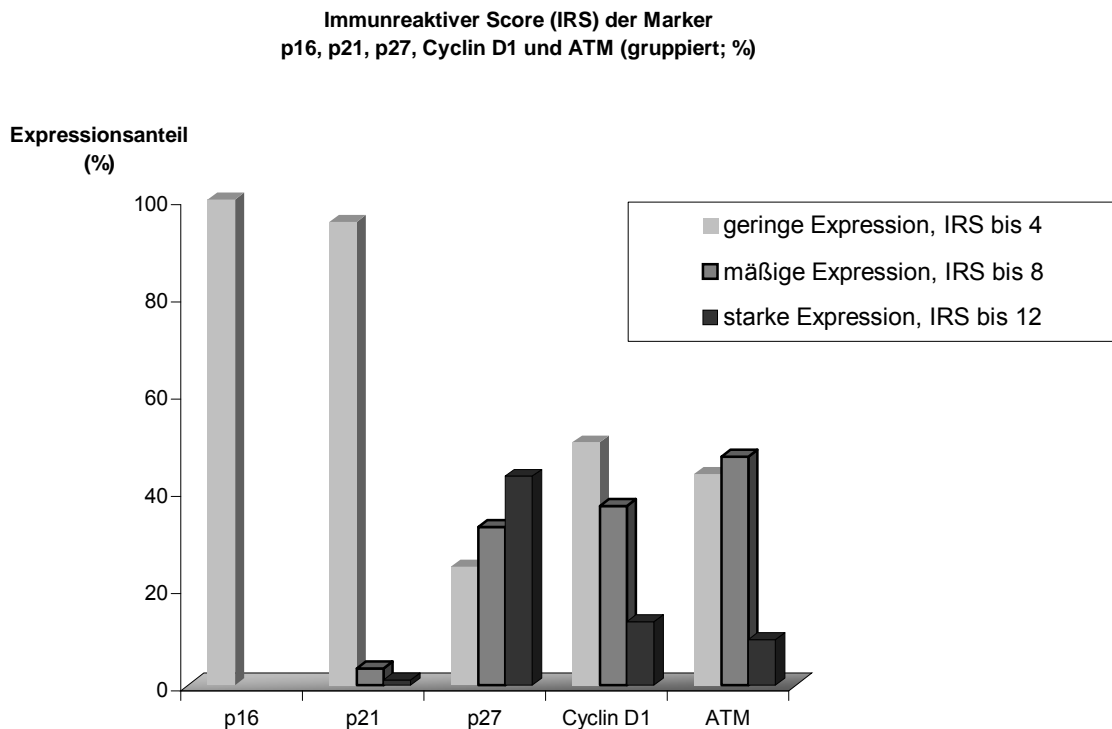


Nukleäre Expression von p21 in SPN aus TMA 1 ( Originalvergrößerung 200x )



Nukleäre Expression von p27 in SPN aus TMA 1 ( Originalvergrößerung 100x )



Graphik1

Um den durchschnittlichen immunreaktiven Score (IRS) der einzelnen Marker zu errechnen, wurde der Durchschnittswert der Intensität der gefärbten Zellkerne mit dem Durchschnittswert der Expressionshöhe der jeweiligen Marker ermittelt und miteinander multipliziert. Die Expressionshöhe wurde zuvor in 4 Gruppen eingeteilt:

Die Gruppe 0 stellte die Werte der Expressionshöhe von  $\geq 0\%$  bis  $\leq 5\%$  dar, Gruppe 1 stellte die Werte von  $> 5\%$  bis  $\leq 25\%$  dar, Gruppe 2 die Werte von  $> 25\%$  bis  $\leq 50\%$ , Gruppe 3 die Werte von  $> 50\%$  bis  $\leq 75\%$  und Gruppe 4 die Expressionswerte von  $> 75\%$  dar.

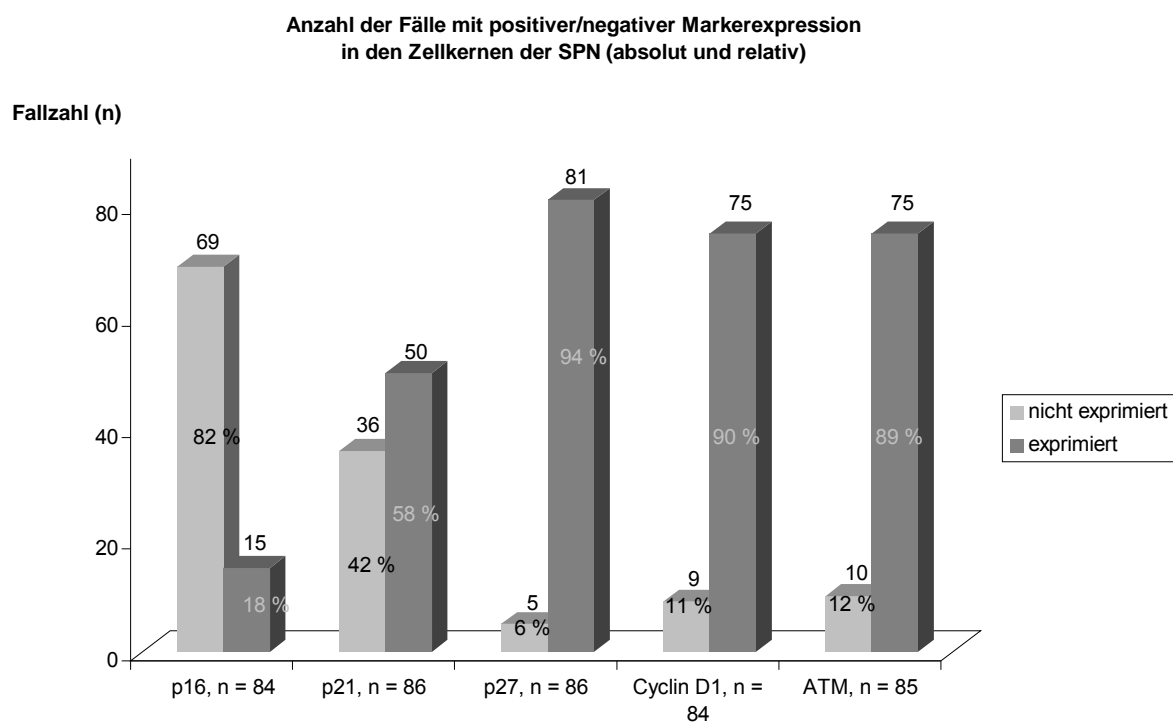
Der IRS von p16 war zu 100% und der von p21 zu 95% schwach ausgeprägt. p27 war der Marker mit dem höchsten Score. Dieser war zu einer Hälfte schwach (zu 24,4%) bis mäßig (zu 32,6%) und zur anderen Hälfte stark (zu 43%) vorhanden. Cyclin D<sub>1</sub> war zu einer Hälfte (50%) gering und zur anderen mäßig (36,9%) bis stark (13,1%) in den Zellkernen der SPN zu finden. ATM ähnelte dem Score-Muster von Cyclin D<sub>1</sub>: Eine Hälfte war schwach (43,5%), die andere mäßig (47,1%) bis stark (9,4%) ausgeprägt.

Der IRS der zwei malignen Neoplasien weiblicher Herkunft war in Bezug auf die drei CDK-Inhibitoren und ATM den gutartigen sehr ähnlich. Nur Cyclin D<sub>1</sub> stach heraus: Statt eines IRS von 3 (geringe Wertigkeit), wie in den benignen Fällen aufzuweisen, ließ sich ein doppelt so hoher Wert messen (6 bzw. mäßige Wertigkeit).

p21 zeigte sich in den benignen SPN mit einer durchschnittlichen Expressionshöhe von 11% und in den zwei malignen Fällen mit einem doppelt so hohen Durchschnittswert von 20%

(15% in dem einen und 25% in dem anderen Fall). Die Intensität der Zellkernfärbung lag anstelle des Durchschnittswertes von 1,4 bei einem Wert von 2,5 für die malignen Tumoren.

## Graphik 2

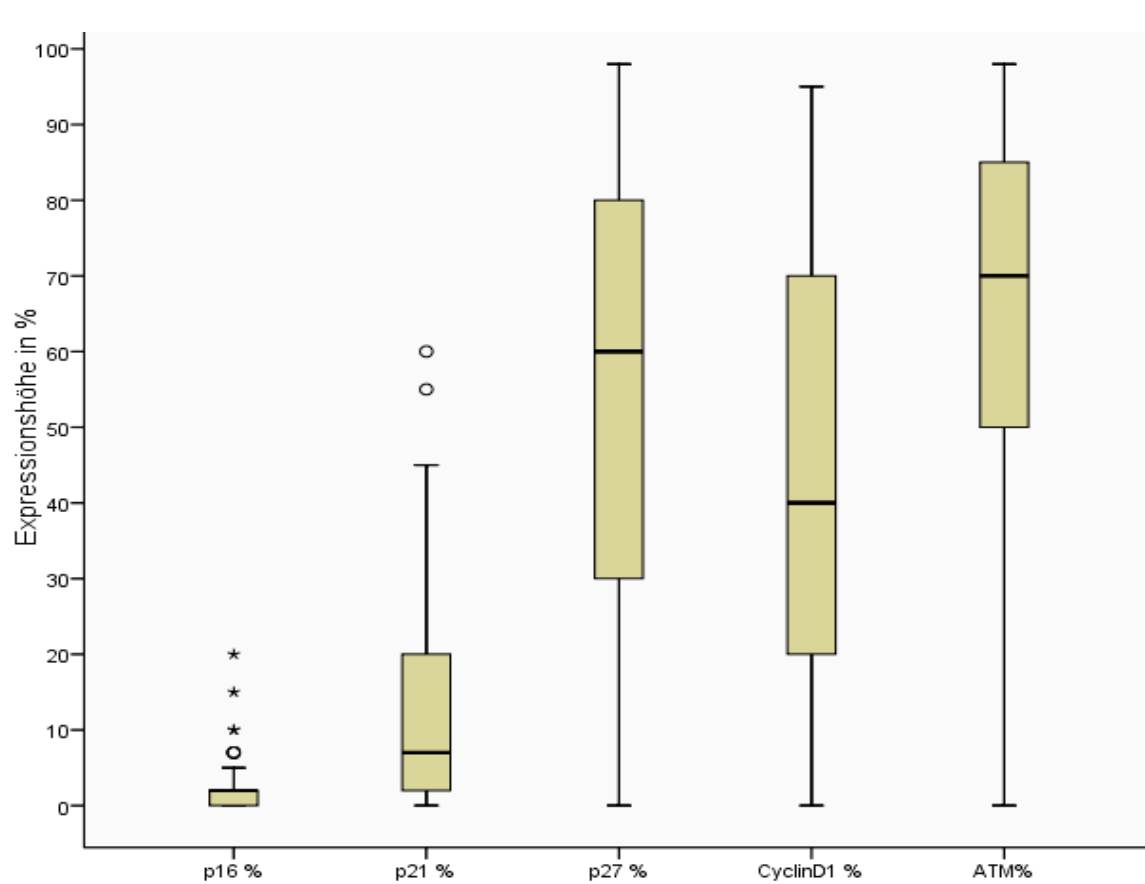


Dieser Graphik ist entnehmbar, in wie vielen Fällen die untersuchten Marker durch eine nukleäre Färbereaktion nachgewiesen werden konnten (relativ und absolut).

ATM (75/85; 89,4%) und Cyclin D<sub>1</sub> (75/84; 89,5%) waren zu fast 90% nukleär vertreten, p27 zu 94,2% (81/86), p21 zu 58,1% (50/86) und p16 nur zu 17,9% (15/84).

Graphik 3

**Gesamtverteilung der Expressionshöhe der Marker in den SPN**  
 (in %; Quartile-, Minimal-, Median-, Maximalwert, Ausreißer)

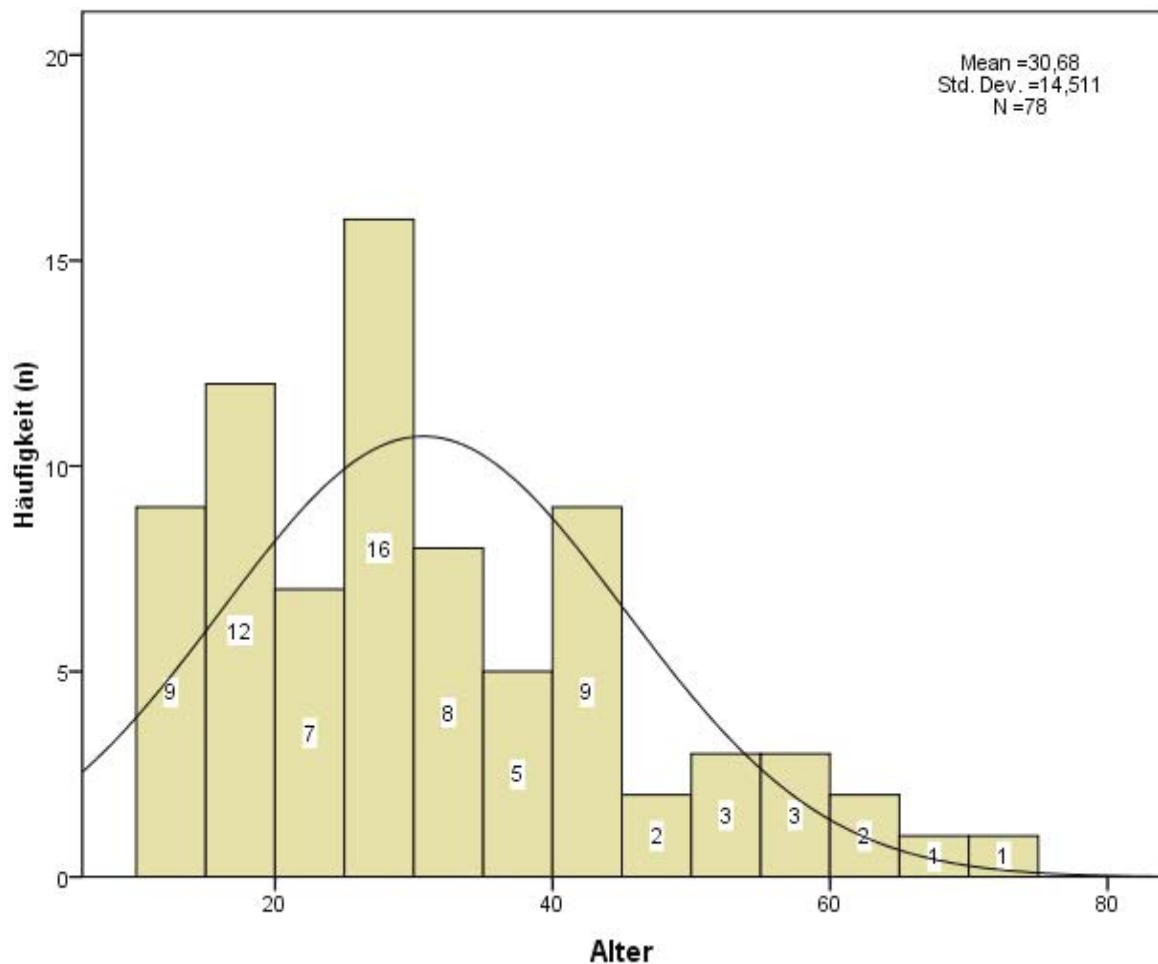


In dieser Graphik ist die Streuung der Expression für die einzelnen Marker in Form von Boxplots dargestellt. Am höchsten streuten in absteigender Reihenfolge die Werte von ATM, p27 und Cyclin D<sub>1</sub>. In einem viel niedrigeren Bereich streuten p21 und besonders p16.

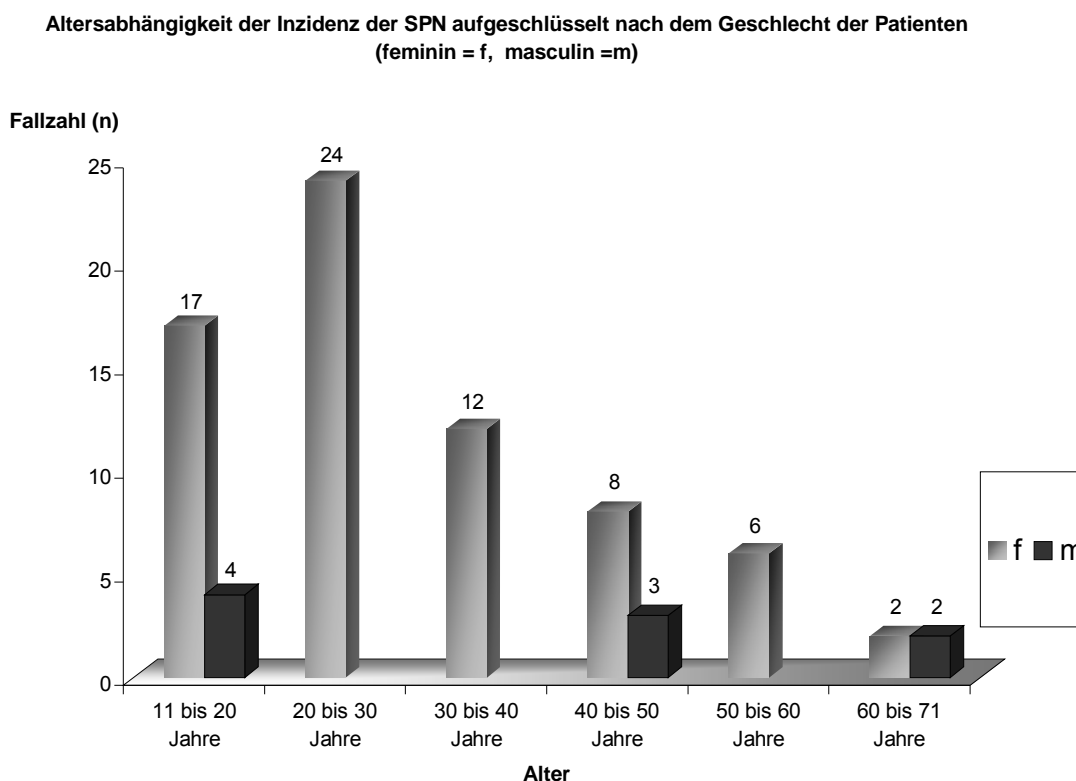
Die Sterne stellen Extremwerte und die Kreise Ausreißer dar.

Graphik 4

**Abhängigkeit der Inzidenz der SPN vom Alter  
(in Jahren)**



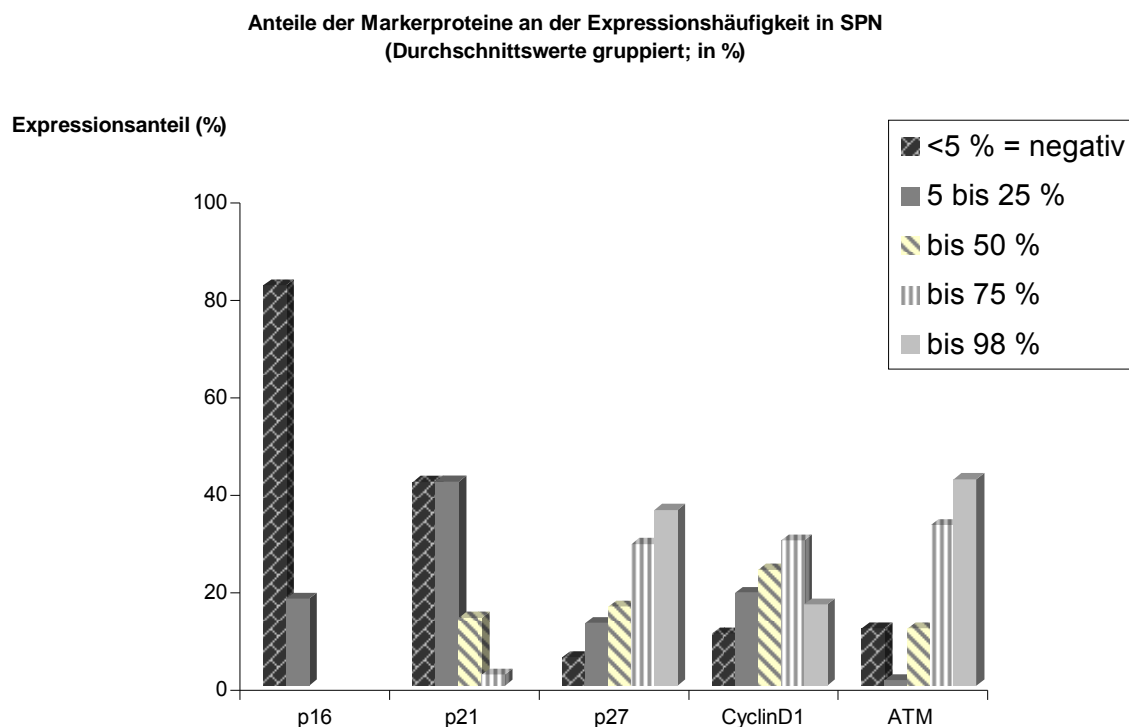
In diesem Histogramm wird der Abfall der Inzidenz der SPN mit Zunahme des Alters deutlich. Es stellt sich eine linksgipfelige Verteilungskurve dar. Die Quartile verteilen sich über das 19. bis 40. Lj. mit einem medianen Wert von 27 Jahren und einem Mittelwert von 30,7 Jahren. Die jüngste Patientin war 11, die älteste 63 und der älteste 71 Jahre alt.

Graphik 5

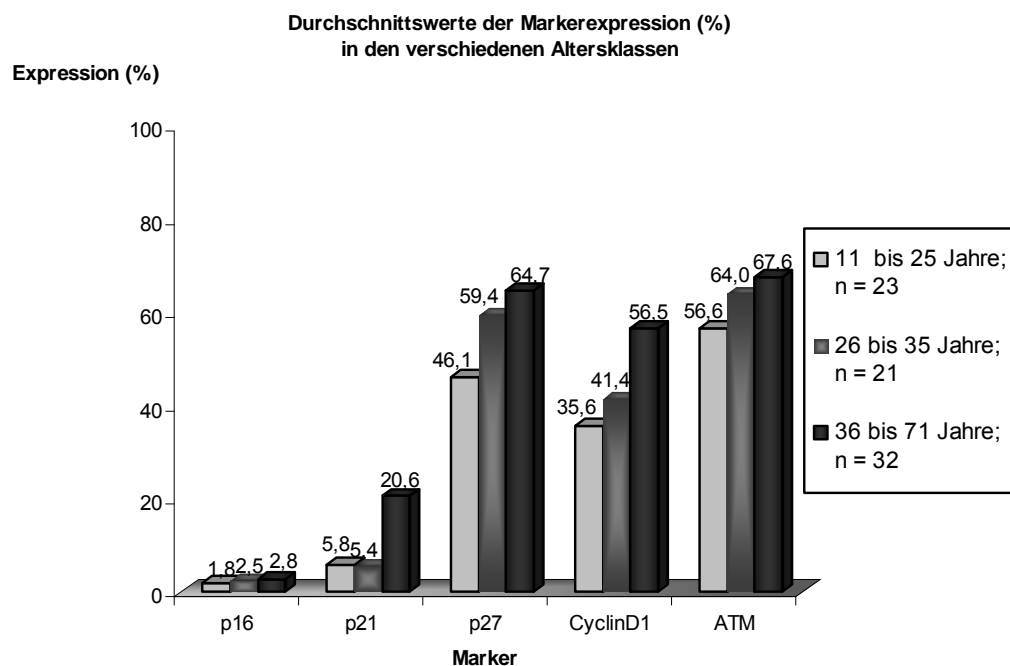
Obiges Diagramm veranschaulicht die Tumorverteilung zwischen den Geschlechtern.

In dem Altersbereich von 19 bis 40 Jahren war ein gehäuftes Auftreten der SPN zu beobachten. Dies stellt jedoch eine Durchschnittsberechnung in Anbetracht beider Geschlechter dar. Bei ausschließlicher Betrachtung der weiblichen Patienten war das höchste Vorkommen der SPN hauptsächlich in dem Altersbereich von 19,5 bis 36,5 Jahren mit einem Peak im 27. Lj. auszumachen. Die älteste Patientin war 63 Jahre und die jüngste 11 Jahre alt. Die männlichen Betroffenen lagen in keinem Fall im Haupt-Altersbereich der weiblichen Fälle, sondern nur jenseits des 19. und 40. Lj. So waren sie in 40% der Fälle (4/9) 12 bis 15 Jahre jung und zu 60% (5/9) 40 bis 71 Jahre alt (siehe Anhang, Tabelle 3).

Da uns nur eine geringe Fallzahl von 9 männlichen Patienten im Vergleich zu 69 weiblichen vorlag, ließen sich in Hinsicht auf geschlechtsspezifische Zusammenhänge keine signifikanten Aussagen treffen. Mit Ausnahme von p16 waren in den männlichen Patienten durchschnittlich insgesamt höhere Werte gemessen worden: p27 war zu 8,8%, p21 zu 6,3%, Cyclin D<sub>1</sub> zu 18,4% und ATM zu 10% stärker vertreten als in den Neoplasien der Patientinnen (siehe Anhang, Tabelle 2).

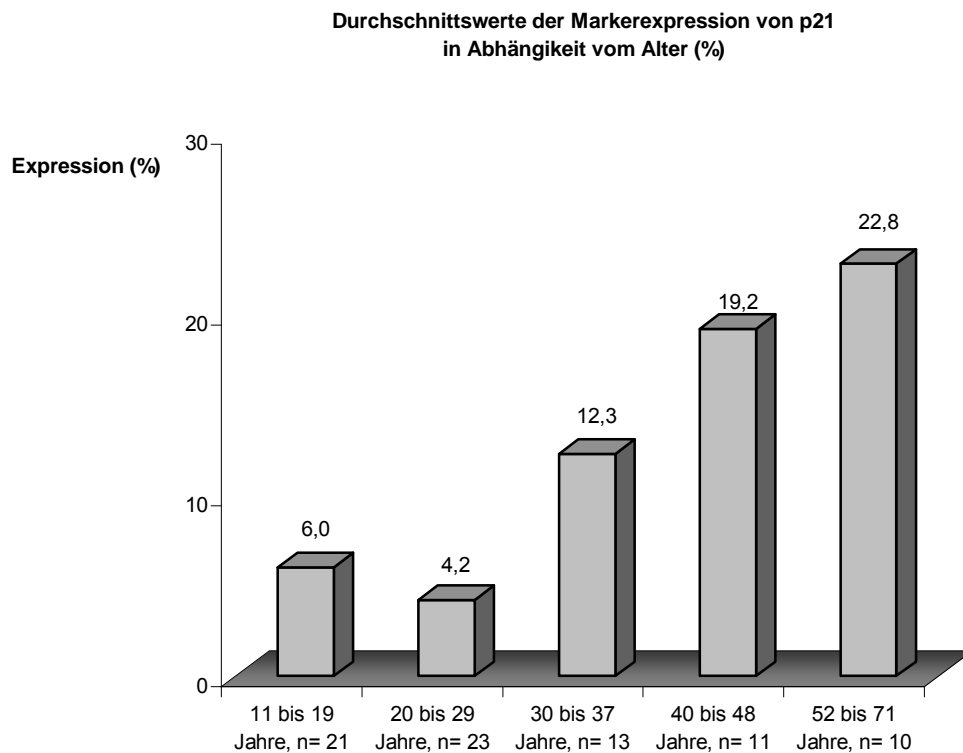
Graphik 6

Für p27, Cyclin D<sub>1</sub> und ATM konnten Expressionshäufigkeiten von bis zu 98% in den Nuklei nachgewiesen werden. Eine nukleäre Färbereaktion der Marker in den SPN mit einem Expressionsanteil von weniger als 5% wurde als negativ gewertet. Somit ergaben die Messwerte für p16 einen negativen Expressionsanteil von 82% und für p21 einen negativen Expressionsanteil von 42%. In den Nuklei war p27 dagegen nur zu 6%, Cyclin D<sub>1</sub> zu 11% und ATM zu 12% nicht exprimiert.

Graphik 7

Durch diese Darstellung entsteht der optische Eindruck einer altersabhängigen Korrelation in Bezug auf die Expressionshöhe für alle Markerproteine. Der Eindruck bestätigte sich jedoch nicht für p16 ( $p = 0,24$ ), nicht für ATM ( $p = 0,44$ ) und nicht für p27 ( $p = 0,06$ ). Jedoch ergaben sich aussagekräftige Signifikanzen insbesondere für p21 ( $p < 0,01$ ) und Cyclin D<sub>1</sub> ( $p = 0,01$ ). Beide zeigten nach dem 35. Lj. eine deutliche Steigerung der Expressionshöhe auf.

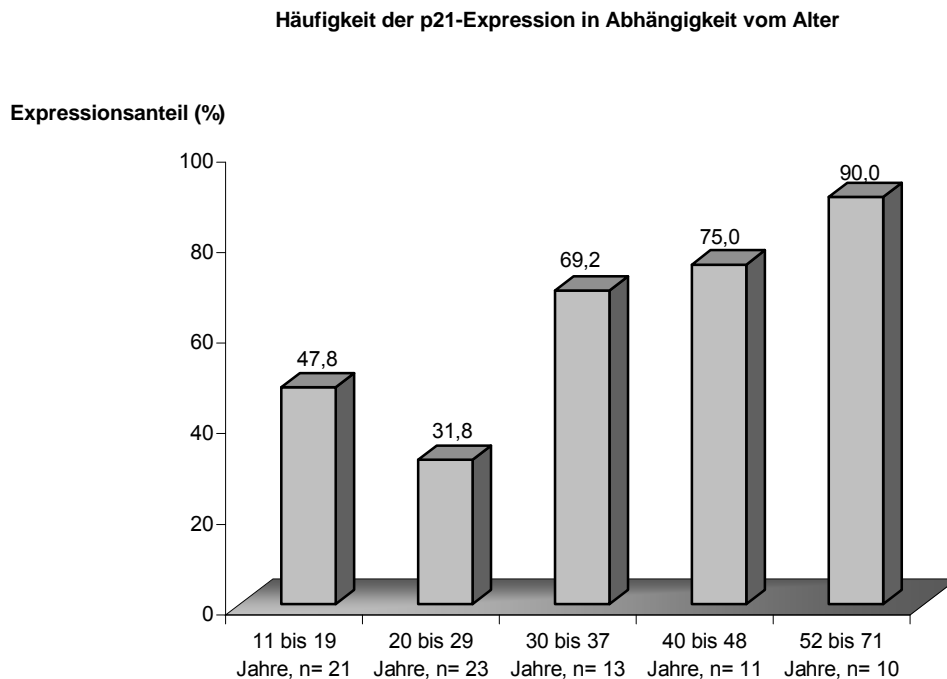
Mit Ausnahme von p16 lag bei allen Markern eine hochsignifikante Korrelation auf dem Niveau  $p < 0,01$  zwischen der Expressionsintensität und -höhe vor. Je größer also die Expressionshöhe in den Zellkernen war, desto stärker war die Intensität dieser Expression bzw. die Zellkernfärbung.

Graphik 7.1

Wenn man den Durchschnittswert der Expressionshöhe für p21 von 5% zugrunde legt, der zwischen dem 11. und 29. Lj. vorherrschte, hatte sich im Vergleich fast eine Vervielfachung der Markerexpression nach dem 39. Lj. ergeben. Der Zusammenhang zwischen steigendem Alter bei steigender Expression stellte sich hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) dar.

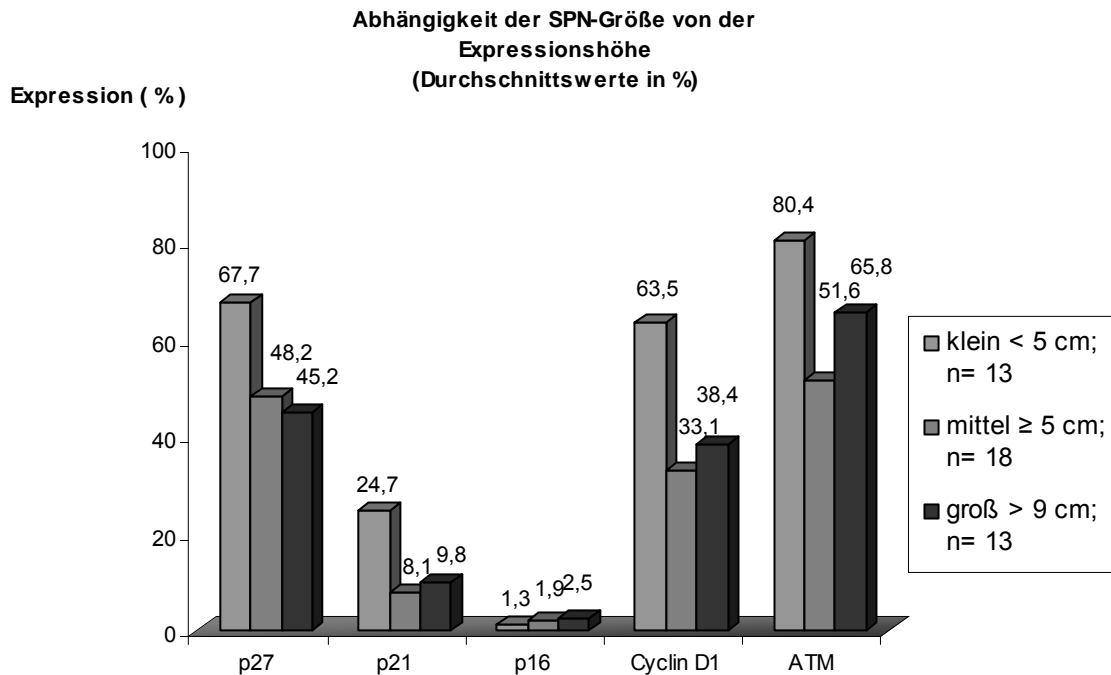
Bei alleiniger Betrachtung der weiblichen Patienten ergab die statistische Analyse gleichfalls einen hochsignifikanten Zusammenhang ( $p < 0,01$ ) zwischen dem Alter und der Expressionshöhe von p21. Für die männlichen Patienten lieferte die Analyse mit  $p = 0,06$  beinahe signifikante Resultate. Allerdings ist aufgrund der geringen Fallzahl männlicher Patienten die Aussagekraft gering.



Graphik 7.2

Wie oben erläutert, sank die Inzidenz der SPN mit steigendem Alter der Patienten. In der sinkenden Anzahl der Patientenfälle mit diesen Neoplasien war die Expressionshäufigkeit von p21 in signifikant steigendem Maße erhöht. Dies fand sich bei gemeinsamer Betrachtung der Geschlechter nur für p21 und wurde als signifikant eingestuft ( $p = 0,02$ ). Bei den anderen untersuchten Markern war weder eine Zu- noch eine Abnahme des Expressionsanteils in Korrelation zum Alter erkennbar [p16 ( $p = 0,1$ ), p27 ( $p = 0,7$ ), Cyclin D<sub>1</sub> ( $p = 0,8$ ) und ATM ( $p = 0,8$ )].

Hinzuzufügen ist jedoch, dass sich die Zunahme des Expressionsanteils von p21 bei getrennter Betrachtung der Geschlechter nicht signifikant darstellte. Bei alleiniger Betrachtung der weiblichen Patienten beispielsweise lag die Irrtumswahrscheinlichkeit nur noch bei  $p = 0,06$ .

Graphik 8

In den Nuklei kleiner Tumoren (< 5cm) wies die Expression aller Markerproteine außer für p16 durchschnittlich höhere Werte auf. Dabei zeigte sich erstmals, dass ein hochsignifikanter Zusammenhang zwischen der Größe der Neoplasien und dem Markerprotein Cyclin D<sub>1</sub> ( $p < 0,01$ ) besteht. SPN mit einem Durchmesser von unter 5 cm wiesen hochsignifikant mehr Cyclin D<sub>1</sub> auf als Neoplasien größeren Durchmessers. In Hinblick auf einen solchen Zusammenhang und entgegen dem optischen Eindruck des Diagramms lieferten die Daten für die anderen untersuchten Proteine p21 ( $p = 0,16$ ), p27 ( $p = 0,1$ ), ATM ( $p = 0,1$ ) und p16 ( $p = 0,3$ ) keine signifikanten Ergebnisse. Ab einer Tumorgöße von 5 cm (mittelgroße bis große SPN) unterschied sich die Expressionshöhe der fünf Marker nicht signifikant.

## 5. Diskussion

Die SPN des Pankreas wurden erstmalig im Jahre 1959 von Virginia Frantz als papilläre Tumoren beschrieben.<sup>19</sup> Es handelt sich hierbei um eine Neoplasie, die selten in nur 1-2% aller exokrinen Tumoren des Pankreas auftritt und dabei vornehmlich Frauen<sup>2,3</sup> betrifft. Das mittlere Erkrankungsalter der weiblichen Patienten liegt bei 30,1 Jahren. Ein ungelöstes Rätsel war bisher, warum die SPN ein langsames Wachstum aufweisen und meistens benigne auftreten, obwohl eine Überexpression von Cyclin D<sub>1</sub> vorliegt. Ebenso stellte sich in diesem Zusammenhang die Frage, in welcher Form der Wnt-Signalweg beeinflusst wird und welche Signifikanz das Chromosom 11q hierbei einnimmt. Erörtern wollten wir darüber hinaus den Einfluss des Alters und des Geschlechts der Patienten auf die Entstehung der Neoplasien.

Wegen der auffälligen Akkumulation der Markerproteine p21, p27, FLI-1, CD56, Cyclin D<sub>1</sub> und des Progesteron-Rezeptors in den SPN, deren Gene, mit Ausnahme von p21 und p27, auf dem langen Arm des Chromosoms 11 liegen, kann man annehmen, dass in dieser Region Translokationen oder Mutationen bestehen, die maßgeblich an der Tumorgenese beteiligt sind. Alternativ ist eine mögliche Aktivierung der Transkription, ausgelöst durch eine Punktmutation an Exon 3 auf dem kurzen Arm des Chromosom 3 des  $\beta$ -Catenin-Gens, in Erwägung zu ziehen. Dies ist die einzige bisher bewiesene konstitutive genetische Veränderung in den Tumoren.<sup>17</sup> In Übereinstimmung mit der Gutartigkeit dieser Neoplasien konnten indes grobe genetische Aberrationen und eine ews-Translokation durch vergleichende In-situ- und Genomhybridisierung ausgeschlossen werden.<sup>9</sup> Überdies konnte auch keine Inaktivierung von p53 nachgewiesen werden.<sup>17</sup> Diese Inaktivierung ist üblicherweise mit einer Überexpression der CDK-Inhibitoren p21 und p27 vergesellschaftet.<sup>21,27</sup> Genauso ungeklärt wie die Überexpression von p21 und p27 ist die Cyclin D<sub>1</sub> Überexpression. Diskutiert werden diesbezüglich weniger genetische Ursachen als Zusammenhänge mit der Aktivierung des Wnt/ $\beta$ -Catenin-Weges, da sich die Gene für Cyclin D<sub>1</sub> in der Nähe des Zentromers auf Chromosom 11q13 befinden und nicht in Aneinanderreihung mit ATM, FLI-1, CD56 und dem Progesteron-Rezeptor auf 11q22-24.<sup>17,9</sup> Da sich die Gene, die für das Tumorsuppressor-Protein ATM kodieren, ebenfalls auf dem Chromosom 11 befinden, haben wir es in die Analysen miteinbezogen. Es erschien jedoch unverändert regulär exprimiert. Somit ist ein Einfluss dieses Tumorsuppressors auf die Genese oder Progression der SPN unwahrscheinlich.

Die konsistente Überexprimierung von Cyclin D<sub>1</sub> in den Tumorzellen wird damit erklärt, dass das  $\beta$ -Catenin der intrazytoplasmatischen Phosphorylierung und Degradation entgeht und an den T-Zell-Transkriptionsfaktor/lymphoid enhancer-binding factor (Tcf/Lef) bindet. Der  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef-Komplex wird daraufhin, auf Grund der eingangs erwähnten konstitutiven

Mutation in Exon 3 des  $\beta$ -Catenin Gens in den Zellkern eingeschleust und nukleär exprimiert.<sup>22</sup> Diese Mutation wurde in 83-90% der SPN vorgefunden. Da  $\beta$ -Catenin für gewöhnlich membranär exprimiert wird, stellt dies eine aberrante Expression dar.<sup>21,22</sup> Durch den  $\beta$ -Catenin-Tcf/Lef Komplex werden daraufhin einige Onkogene im Zellkern transkribiert, wie beispielsweise die für Cyclin D<sub>1</sub>,<sup>28</sup> welches sich sodann immunhistochemisch überexprimiert darstellt.<sup>22</sup> Es ist ein Zellzyklus-assoziiertes Protein, zu dessen primären Zielen der Wnt-Signalweg gehört.<sup>25,4</sup> Es bildet mit Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) einen Komplex und phosphoryliert das Retinoblastom-Protein (pRb). Diese Phosphorylierung kann verhindert werden, indem p21, p27 oder p16 an den Cyclin D<sub>1</sub>/CDK4-Komplex binden und damit die Aktivität des Zellzyklus hemmen.<sup>29</sup> Durch diese Blockade ist der Cyclin D<sub>1</sub>/CDK4 Komplex nicht mehr in der Lage, eine (Hyper-) Phosphorylierung des Retinoblastom-Proteins (pRb) zu bewirken. Diese Annahme wurde durch den fehlenden immunhistochemischen Nachweis von phosphoryliertem pRb in den SPN unterstützt.<sup>30</sup> Die Hemmung wiederum macht die Transkription durch den Transkriptionsfaktor E2F unmöglich und führt zum Zellzyklusarrest, da der Eintritt in die S-Phase unterbunden ist. Die Inhibition des  $\beta$ -Catenin-Signalwegs führt dazu, dass diese seltenen Tumoren ein benignes Verhalten aufweisen. Dennoch sind sie in der Lage sehr groß zu werden (in Einzelfällen bis zu 17cm).<sup>4</sup> Findet diese Inhibition nicht statt, wird der Zellzyklus am Checkpoint zwischen G<sub>1</sub>- und S-Phase angetrieben. Aufgrund dessen steht Cyclin D<sub>1</sub> häufig in Zusammenhang mit einer erhöhten Proliferationsrate und einer schlechten Prognose<sup>30</sup> bzw. in Verbindung mit der Progression verschiedenster Karzinome.<sup>23,24</sup> Dazu passend lag der IRS (Immune Reactive Score) von Cyclin D<sub>1</sub> in den uns vorgelegenen zwei malignen Fällen doppelt so hoch wie in den benignen, nämlich bei einem mäßigen IRS von 6 statt bei einem schwachen IRS von 3. Unklar ist, wieso sich in den zwei malignen Fällen p21 mit einem Durchschnittswert von 20% ebenfalls fast doppelt so hoch wie in den benignen Entitäten, in denen der Wert bei nur 11% lag, zeigte. Diese Resultate besitzen allerdings aufgrund der geringen Fallzahl der malignen Neoplasien wenig Aussagekraft.

In einer vorhergehenden Studie von Tiemann et al. (2007) waren ca. 69% (62/90) der Zellkerne für Cyclin D<sub>1</sub> angefärbt worden. Wir fanden Cyclin D<sub>1</sub> hingegen zu 89,4% (75/84) vor. Möglicherweise hängt dies mit den unterschiedlichen Herstellern der Antikörper und den verschiedenen Detektionsmethoden zusammen, die in diesen beiden Untersuchungen verwendet wurden. Die von uns genutzte EnVision-Methode ist den Hersteller-Angaben nach sensitiver als die herkömmliche Avidin-Biotin-Methode, da sie über eine höhere Anzahl von Enzymmolekülen verfügt. Diese wie vorherige Studien<sup>31,32</sup> ergaben ein Verhältnis von weiblichen zu männlichen Patienten mit SPN des Pankreas von 8:1. Die Inzidenz der SPN war dabei signifikant vom Alter der Patienten abhängig ( $p < 0,05$ ). Am häufigsten waren Patientinnen in der Altersspanne zwischen 19,5 bis 36,5 Jahren mit einem Peak im 27. Lj.

vorhanden gewesen.

Die männlichen Patienten mit SPN des Pankreas befanden sich hingegen überraschenderweise genau in den Altersbereichen, in denen die Frauen nur unterdurchschnittlich oft betroffen waren. Vier männliche Patienten befanden sich im Bereich des 12. bis 15. Lj. und fünf weitere im Bereich des 40. bis 71. Lj. (s. Anhang; Tabelle 3). Da die SPN fast ausnahmslos Progesteron-Rezeptoren aufweisen,<sup>9</sup> liegt die Vermutung nahe, dass sie hormonsensitiv reagieren und maßgeblich an geschlechtsspezifischen Unterschieden beteiligt sind. Wie vorhergehende Studien zeigten, wirken Progesteron und Östradiol auf die Expression von p21 und p27<sup>33,34</sup> sowie auf Cyclin D<sub>1</sub>.<sup>35,36</sup> Demzufolge beeinflussen sie den Ablauf des Zellzyklus und haben damit Einfluss auf Wachstum und Dignität der SPN. Dies würde erklären, warum hauptsächlich Frauen von diesem Tumor betroffen sind. Bekanntermaßen produziert der männliche Organismus ungleich weniger dieser weiblichen Hormone. Infolgedessen ist es denkbar, dass ein Zusammenhang zwischen der Inzidenz der SPN und dem Östradiol- und Progesteron-Spiegel im Blut besteht. Dafür spricht der Inzidenzabfall der SPN bei den weiblichen Patienten nach dem 36,5. Lj., da ab dem Lebensabschnitt der Östradiol- und Progesteron-Spiegel zu sinken beginnt und das Klimakterium um das 40. Lj. allmählich eingeleitet wird.<sup>37</sup> Für diese Hypothese spricht auch das erstmalige Auftreten der SPN in dieser Untersuchung, denn es fällt mit dem Beginn der Pubertät (hier: 11. Lj. bei einem Mädchen) zusammen, also einer erhöhten Östradiol- und Progesteronproduktion.<sup>38</sup> Die jüngsten männlichen Patienten befanden sich bei Diagnose ebenfalls in der Pubertät. Sie waren 12 bis 15 Jahre alt. Normalerweise wird in diesem Alter zunehmend Progesteron zur Testosteronproduktion gebildet. In diesen Jugendlichen könnte jedoch eine hormonelle Dysregulation, die mit geringerer Umsetzung zu Testosteron einhergeht, die Ursache für die Entstehung der Neoplasien sein. Nach diesem Lebensabschnitt fanden sich männliche Betroffene, in der uns vorgelegenen Kohorte, erst ab dem 40. Lj. wieder. Um dieses Lj. herum nimmt die Serumtestosteron-Produktion langsam ab (im Durchschnitt < 2% / Jahr).<sup>41</sup> Parallel dazu steigt das serumbindende Globulin (SHBG) an, wodurch das freie Testosteron noch weiter absinkt.<sup>42</sup> So fällt der Testosteronspiegel bis zum 70. Lj. allmählich auf bis zu 50% seines Ausgangswertes ab. Der Progesteron-Spiegel hingegen bleibt etwa bis zum 70. Lj. in den Männern gleich hoch.<sup>40</sup> Entsprechend war der älteste Patient unserer Serie 71 Jahre alt.

In dem Lebensabschnitt, in dem das Serumtestosteron abnimmt, erhält vermutlich das Progesteron, aus dem weniger Testosteron umgesetzt wird, größeren Einfluss auf den Zellzyklus und fördert die Entstehung der SPN in den männlichen Patienten. Überdies gesellte sich zu dem Absinken der männlichen Hormone als ein weiterer Faktor das Cyclin D<sub>1</sub>. Es war zu durchschnittlich 18,4% stärker als in den SPN der Frauen vertreten und begünstigte die Entstehung dieses benignen Tumors. Dieser Zusammenhang könnte

erklären, warum die männlichen Patienten erst in höherem Alter wieder betroffen waren.

Den Resultaten der Untersuchung zufolge lag der Durchschnittswert des Anteils der Expression für p21 bei Betroffenen der Altersgruppe von 11 bis 29 Jahren bei 40%. Der Wert für die Altersgruppe 30 bis 71 Jahre war dagegen fast doppelt so hoch und lag bei 78% (siehe Graphik 7.2). Wir konnten beweisen, dass ein signifikanter Zusammenhang ( $p=0,02$ ) zwischen dem Anteil der p21 Expression und der Alterszunahme bei gemeinsamer Betrachtung beider Geschlechter besteht; nicht jedoch bei getrennter Betrachtung. Überdies war es gleichzeitig durchschnittlich höher exprimiert ( $p<0,01$ ). Nach dem 29. Lj. hatte, wie die Graphik 7.1 zeigt, annähernd eine Vervierfachung der ursprünglichen Werte stattgefunden. Diese, beide Geschlechter berücksichtigenden, Durchschnittswerte der Expressionshöhe von p21 ähnelten dem immunhistochemischen Profil der SPN weiblicher Patienten stark. Bei diesen hatte eine Verdreifachung der Werte nach dem 29.Lj. stattgefunden (von 5,3% auf 16,2%). Der Zusammenhang zwischen einer Steigerung der Expressionshöhe bei steigendem Alter der Betroffenen stellte sich auch hochsignifikant dar ( $p<0,01$ ). Die Werte der männlichen Patienten für p21 waren in Bezug auf die Expressionshöhe nach dem 40. Lj. sogar um das Achtfache gestiegen (siehe Tabelle 3). Unsere Analysen konnten jedoch aufgrund der geringen Fallzahl männlicher Patienten keine signifikanten Resultate liefern. Zur Wachstumshemmung durch p27 kam also in der älteren Patientengruppe verstärkt und unterstützend p21 hinzu. Die Steigerung der Expressionshöhe von p21 ist, zumindest in den weiblichen Patienten, möglicherweise die Ursache für die geringere Häufung der SPN in höherem Alter.

Passend zu der Erhöhung der Werte von p21 nach dem 29. Lj. (siehe Graphik 7.1), genauer gesagt nach dem 36. Lj. (siehe Tabelle 3), war bei diesen eine kontinuierliche Abnahme der Inzidenz der SPN nach dem 36,5 Lj. zu verzeichnen. Die Verachtfachung der Expressionshöhe von p21 nach dem 40. Lj. in den männlichen Patienten schien dagegen bei diesen keine hemmende Wirkung auf das Auftreten der SPN gehabt zu haben. Dies ist vermutlich auf den, zu durchschnittlich 18,4% in den männlichen Betroffenen vermehrt vorkommenden, Gegenspieler Cyclin D<sub>1</sub> zurückzuführen.

Die Expressionshöhe von Cyclin D<sub>1</sub> wies ebenfalls bei Betrachtung der Durchschnittswerte unter Einbeziehung beider Geschlechter, mit steigendem Alter der Patienten, hochsignifikante Werte auf ( $p<0,01$ ). Dies traf jedoch nicht auf die Expressionshäufigkeit zu. Signifikante Werte ergaben sich ebenso für Cyclin D<sub>1</sub> ( $p=0,03$ ) bei alleiniger Berücksichtigung der weiblichen Patienten mit SPN des Pankreas in Bezug auf die Expressionshöhe und steigendem Alter. Der Wert hatte sich um 14,8% (von 42,9% zwischen dem 11. und 15. Lj. auf 57,7% zwischen dem 40. und 63. Lj.) erhöht. In den SPN der männlichen Betroffenen dagegen betrug diese Steigerung der Expression sogar 40% (von 37,5% zwischen dem 12. und 15. Lj. auf 77,5% zwischen dem 40. und 65. Lj.). Die

Steigerung in den männlichen Patienten lag demnach um 25,2% höher als bei den Patientinnen.

Da der CDK-Inhibitor p21 mit zunehmendem Alter in den SPN durchschnittlich stärker exprimiert wurde, liegt die Schlussfolgerung nahe, dass diese Zunahme auf den, mit dem Alter sinkenden, Hormonspiegel von Östradiol und Progesteron zurückzuführen ist. Progesteron besitzt unter anderem die Fähigkeit, die Transkription von p21 über Faktoren in der p21-Promoterregion zu regulieren. In Abhängigkeit von den Zielzellen kann dies proliferative oder differenzierende Auswirkungen haben.<sup>39</sup> Aus den Ergebnissen wird ersichtlich, dass das Progesteron seinen hemmenden Einfluss auf die p21-Transkription in den weiblichen Betroffenen schon mit Beginn des nahenden Klimakteriums in immer geringer werdendem Maße ausüben konnte. So konnte vermehrt p21 transkribiert werden, was wiederum zur Unterbrechung des aktivierten Wnt-Signalweges führte und damit in den weiblichen Patienten zum Abfall der SPN-Inzidenz bei steigendem Lebensalter führte.

Überdies konnten wir nachweisen, dass neben p21 auch Cyclin D<sub>1</sub> mit fortschreitendem Alter vermehrt auftrat. Unsere Analyse ergab bei gemeinsamer Betrachtung beider Geschlechter sowie bei ausschließlicher Betrachtung der weiblichen Patienten hochsignifikante Ergebnisse ( $p < 0,01$ ).

p16 wurde überzufällig häufig in vielen Geweben von älteren Patienten, einhergehend mit einer verminderten Regenerationsfähigkeit, entdeckt.<sup>43</sup> Daraus schlussfolgerte man, dass mit steigendem Lebensalter generell eine Akkumulation von p16 stattfindet.<sup>44,9</sup> Man zog Parallelen zu Patienten mit SPN des Pankreas und fand p16 in zwei Fällen bei deutlich älteren Patienten erhöht vorliegen.<sup>9</sup> Die Hypothese eines Zusammenhanges zwischen vermehrter Expression von p16 in Patienten höheren Alters mit SPN des Pankreas ließ sich jedoch in der vorliegenden Arbeit nicht mit signifikanten Ergebnissen untermauern ( $p = 0,24$ ). Normalerweise ist der Zellzyklus beschleunigt, wenn der CDK-Inhibitor p16 nicht nachgewiesen werden kann.<sup>43</sup> Da p16 (15/84; 18%) nur selten vorlag, das Wachstum der Neoplasien aber nicht demgemäß zugenommen hatte, muss man annehmen, dass hauptsächlich die Expression von p21 und p27 eine Unterdrückung des Zellzyklus und damit eine niedrige Proliferationsrate bedingt haben. Zumal in dieser Untersuchung p21 schwach bis mäßig stark ausgeprägt war (50/86; 58%), wird vor allem das stärker exprimierte p27 (81/86; 94%) einen hemmenden Effekt ausgeübt haben. Zu beachten ist jedoch, dass p21 in den weiblichen Patienten mit zunehmendem Alter nachweislich allmählich einen größeren Einfluss nahm.

p21 und p27 schienen mit Cyclin D<sub>1</sub> (75/84; 89%) einen sich gegenseitig ausgleichenden Einfluss auf den Wnt-Signalweg und damit auf die Proliferationsaktivität genommen zu haben. Dadurch war den SPN ein langsames, jedoch enormes Größenwachstum (bis zu 17cm) möglich.

In Bezug auf die Expressionshöhe zeigten die Marker p21, p27, Cyclin D<sub>1</sub> und ATM statistisch signifikante bis hochsignifikante Korrelationen untereinander auf, d.h. die Markerprofile ähnelten einander. p27 und p21 korrelierten auf dem Signifikanzniveau  $p = 0,03$ ; alle anderen dagegen korrelierten miteinander auf dem hochsignifikanten Niveau von  $p < 0,01$ . Sie reagierten abhängig voneinander und unterlagen einem System sich gegenseitig beeinflussender Wechselwirkungen. Nur p16 schien unabhängig zu agieren und wies keinerlei Gemeinsamkeiten mit den genannten Markern bezüglich der Immunpositivität im lichtmikroskopischen Bild auf.

In dieser Arbeit konnte erstmalig, entgegen einer vorhergehenden Studie an SPN und neuroendokrinen Tumoren des Pankreas,<sup>9</sup> eine Verbindung zwischen dem Tumorstadium und der Expressionshöhe eines Markerproteins, hier Cyclin D<sub>1</sub>, ausgemacht werden (siehe Graphik 8). Wir konnten beweisen, dass Cyclin D<sub>1</sub> in hochsignifikantem ( $p < 0,01$ ) Maße in kleinen Neoplasien (Durchmesser  $< 5$  cm) deutlicher aktiviert vorliegt als in SPN größeren Durchmessers. Dies spricht für ein hohes Wachstumspotential der noch kleinen Entitäten, die sich erst am Anfang ihrer Entwicklung befinden. In den wenigen Fällen, in denen die immunhistochemische Färbung für Cyclin D<sub>1</sub> negativ ausfiel (9/88), war demgemäß kein Tumor kleinen Durchmessers vorhanden gewesen. Ein signifikanter Zusammenhang zwischen der Größe der SPN und dem Lebensalter der Patienten ließ sich dennoch nicht nachweisen.

Zukünftig gilt es unter anderem zu klären, welcher Ursprung den SPN zugrunde liegt, wie sie entstehen und wie es zu der vermehrten Expression der CDK-Inhibitoren in den Zellkernen der SPN kommt. Hierfür sind weitergehende molekulargenetische Untersuchungen vonnöten. Ferner wäre zu untersuchen, ob sich der immunreaktive Score zur Beurteilung der Dignität der SPN eignet.



## 6. Zusammenfassung

Die World Health Organisation der Vereinten Nationen hat die solid-pseudopapilläre Neoplasie des Pankreas (SPN) als eine seltene, meist benigne Neoplasie des exokrinen Pankreas mit niedrig maligner Potenz bezeichnet.<sup>1</sup> Wie in vorhergehenden Studien,<sup>31,32</sup> waren in der uns vorgelegenen Serie Frauen achtmal häufiger mit SPN des Pankreas angetroffen worden als Männer. Das Alter der weiblichen Patienten lag im Mittel bei 30,1 Jahren, wobei keine Patientin jünger als 11 Jahre war.<sup>2,3</sup>

Diese Arbeit befasst sich mit folgendem Fragenkomplex: Warum vor allem junge Frauen betroffen sind, warum diese trotz der ausgeprägten Expression von Cyclin D<sub>1</sub> in den Zellkernen eine niedrige Proliferationsaktivität aufweisen und welche Rollen in diesem Zusammenhang das Chromosom 11q und der Wnt-Signaltransduktionsweg einnehmen.

In dieser immunhistochemischen Untersuchung konnten wir feststellen, dass die Inzidenz der SPN geschlechts- und altersabhängig ist. Die uns vorgelegenen neun männlichen Fälle wurden lediglich zwischen dem 12. und 15. Lj. (Lebensjahr) und dem 40. und 71. Lj. angetroffen. Interessanterweise war dies der Bereich, in dem sich die weiblichen Patienten unterdurchschnittlich häufig fanden. Hauptsächlich waren Patientinnen im Altersbereich zwischen 19,5 bis 36,5 Jahren mit einem Häufigkeitsgipfel im 27. Lj. betroffen. Da die SPN konstant Progesteron-Rezeptoren in den Zellkernen aufweisen, kann man annehmen, dass neben Östradiol vor allem das Progesteron begünstigend auf das Wachstum der Tumoren wirkt. Demgemäß wurden die ersten Patientinnen mit SPN im 11. Lj., also mit Beginn der Pubertät und damit einhergehendem steigenden Progesteron-Spiegel, angetroffen.<sup>38</sup> Mit Einleitung des Klimakteriums, um das vierte Lebensjahrzent herum, sinkt der Progesteron-Spiegel<sup>37</sup> und mit diesem die Inzidenz der SPN. Demgemäß konnten wir zeigen, dass die Inhibition der Zellzyklusaktivität in den SPN mit steigendem Patientenalter insbesondere durch p21 signifikant zunimmt. Entsprechend der auffälligen signifikanten Steigerung der Expressionshöhe von p21 nach dem 36. Lj. sank die Inzidenz der SPN nach dem 36,5. Lj. in den weiblichen Patienten signifikant. Man kann also annehmen, dass der Abfall der Östradiol- und Progesteronproduktion den Anstieg von p21 und damit den Abfall der SPN-Inzidenz bewirkte.

Wie oben erwähnt, fanden sich die ersten männlichen Betroffenen mit SPN des Pankreas ebenfalls bei Eintritt der Geschlechtsreife. Offenbar hatte auch hier das Progesteron vermutlich durch eine hormonelle Dysregulation einen stärkeren Einfluss ausüben können. Erst ab dem 40. Lj. traten wieder männliche Patienten mit SPN in der uns vorgelegenen Kohorte auf. Dies ist der Altersabschnitt, in dem die Serumtestosteron-Produktion allmählich abnimmt und weniger Testosteron aus Progesteron umgesetzt wird. Dadurch verändert sich das Gleichgewicht zwischen Testosteron und Progesteron zugunsten des Progesterons, welches dann möglicherweise die Entstehung der SPN bewirken konnte. Außerdem erhält

das Progesteron durch das, in den männlichen Patienten vermehrt transkribierte Zellzyklus-assoziierte Protein Cyclin D<sub>1</sub> eine, das Tumorwachstum begünstigende, Unterstützung. Gewöhnlicherweise steht das, sich in den Zellkernen der Neoplasien überexprimiert zeigende Cyclin D<sub>1</sub>, in Zusammenhang mit einer schlechten Prognose, erhöhten Proliferationsaktivität und Malignität.<sup>32,24</sup> Dementsprechend ließ es sich in dieser Untersuchung in den Zellkernen der einzigen zwei malignen SPN (2/88) durch einen doppelt so hohen immunreaktiven Score wie in den benignen nachweisen. Der Score errechnet sich aus der Multiplikation der Expressionshöhe und – intensität der Markerproteine. Dieser könnte ein Parameter für die Aussage über die Dignität dieser Tumoren darstellen. Indessen steht jedoch aufgrund der geringen Anzahl maligner Fälle eine abschließende Beurteilung aus. Neben der Überexpression von Cyclin D<sub>1</sub> konnten wir ebenfalls die Cyclin-abhängigen Kinase (CDK) – Inhibitoren p16, p21 und p27 in den Zellkernen der SPN in vermehrter Expression nachweisen. Die Ursachen hierfür sind noch ungeklärt. Obwohl der, durch Cyclin D<sub>1</sub> aktivierte, Wnt-Signalweg tätig ist, findet offensichtlich eine erfolgreiche Antagonisierung des CDK<sub>4</sub>/Cyclin D<sub>1</sub>-Komplexes vor allem durch p27, p21 und kaum durch p16 statt. Sie scheinen die Gutartigkeit und die, nach ausreichender Resektion,<sup>6,7,8</sup> exzellente Prognose<sup>5,6</sup> zu bedingen. Offen ist allerdings unter dieser Annahme der stärkere Anstieg der Expressionshöhe von p21 mit zunehmendem Alter in den männlichen Betroffenen. Diese Erhöhung hatte keinen Einfluss auf die Häufigkeit des Auftretens der SPN. Denkbar ist, dass dies auf das, in den männlichen Patienten durchschnittlich stärker exprimierte, Cyclin D<sub>1</sub> zurückzuführen ist.

Zukünftig weiter zu erforschen gilt, der Ursprung dieser Neoplasie, wie die CDK-Inhibitoren in den SPN zur Tätigkeit angeregt werden und auf welcher Ebene das Tumorwachstum eingeleitet wird.

## 7. Literaturverzeichnis

1. **Klöppel G**, Solcia E, Longnecker DS, Capella C, Sobin LH (1996) Histological typing of tumors of the exocrine pancreas. WHO histological classification of tumors, 2<sup>nd</sup> edn. Springer Berlin Heidelberg New York
2. **Cantisani V**, Mortelet KJ, Levy A, Glickman JN, Ricce P, Oassariello R, Ros PR, Silverman SG (2003) MR imaging features of solid pseudopapillary tumor of the Pancreas in adult and pediatric patients. *AJR Am J Roentgenol*, 181:395-401
3. **Coleman KM**, Doherty MC, Bigler SA (2003) Solid pseudopapillary tumor of the pancreas. *Radiographics*, 23:1644-1648
4. **Kosmahl M**, Pauser U, Anlauf M, Sipos B, Peters K, Lüttges J, Klöppel G (2005) Solid pseudopapilläre Neoplasien. *Pathologe*, 26:41-45
5. **Klimstra DS**, Wenig BM, Heffess CS (2000) Solid pseudopapillary tumor of the pancreas: a typically cystic carcinoma of low malignant potential. *Semin Diagn Pathol*, 17:66-80
6. **Klöppel G**, Morohoshi T, John HD, Oehmichen W, Opitz K, Angelkort A, Lietz H, Ruckert K (1981) Solid and cystic acinar cell tumor of the pancreas. A tumor in young woman with favourable prognosis. *Virchows Arch*, 392:171-183
7. **Boor PJ**, Swanson MR (1979) Papillary-cystic neoplasm of the pancreas. *Am J Surg Pathol*, 3:69-75
8. **Hamoudi AB**, Misugi K, Grosfeld JL, Reiner CB (1970) Papillary epithelial neoplasm of the pancreas in a child. Report of a case with electron microscopy. *Cancer*, 26:1126-1134
9. **Tiemann K**, Heitling U, Kosmahl M, Klöppel G (2007) Solid pseudopapillary neoplasms of the pancreas show an interruption of the Wnt-signaling pathway and express gene products of 11q. *Mod pathol*, 20:955-960
10. **Bombi JA**, Milla A, Badal JM, Piulachs J, Estape J, Cardesa A (1984) Papillary cystic neoplasm of the pancreas. Report of two cases and review of the literature. *Cancer*, 54:780-784
11. **Ladanyi M**, Mulay S, Arseneau J, Bettez P (1987) Estrogen and progesterone receptor determination in the papillary cystic neoplasm of the pancreas. With immunohistochemical and ultrastructural observations. *Cancer*, 60:1604-1611
12. **Learmonth GM**, Price SK, Visser AE, emms M (1985) Papillary and cystic neoplasm of the pancreas- an acinar cell tumor? *Histopathology*, 9:63-79

13. **Lieber Mr**, Lack EE, Roberts JR Jr et al (1987) Solid and papillary epithelial neoplasm of the pancreas. An ultrastructural and immunohistochemical study of six cases. *Am J Surg Pathol*, 11:85-93
14. **Herbay A** von, Sieg B, Otto HF (1990) Solid-cystic tumour of the pancreas. An endocrine neoplasm? *Virchows Arch A Pathol Anat*, 416:535-538
15. **Kamiswa T**, Fukayama M, Koike M, Tabata L, Okamoto A (1987) So called "papillary and cystic neoplasm of the pancreas" An immunohistochemical and ultrastructural study. *Acta Pathol Jpn*, 37:785-794
16. **Yaghihashi S**, Sato I, Kainori M, Matsumoto J , Nagai K (1988) Papillary and cystic tumor of the pancreas. Two cases Indistinguishable from islet cell tumor. *Cancer*, 61:1241-1247
17. **Tiemann K**, Kosmahl M, Ohlendorf J et al. (2006) Solid pseudopapillary neoplasms are associated with FLI-1 expression, but not with EWS/FLI-1 translocation. *Mod pathol*, 19:1409-1413
18. **Peters K**, Panieka R, Li J, Klöppel G, Wang RN (2005) Expression of stem cell markers and transcription factors during the remodeling of the rat pancreas after duct ligation. *Virchows Arch*, 446:56-63
19. **Frantz VK** (1959) Tumors of the pancreas. *AFIP Atlas of tumor pathology*, 1<sup>st</sup> series section 7, fascicles 27 and 28. Armed forces Institute of Pathology, Washington, DC.
20. **Cubilla AL**, Fitzgeralds PJ (1984) Tumors of the exocrine pancreas. *AFIP Atlas of tumor pathology*, 2<sup>nd</sup> series, fascicle 19. Armed forces Institute of Pathology, Washington, DC
21. **Abraham SC**, Klimstra DS, Wilentz RE et al. (2002) Solid-pseudopapillary tumors of the pancreas are genetically distinct from pancreatic ductal adenocarcinomas and almost always harbor  $\beta$ -catenin mutations. *Am J Pathol*, 160: 1361-1369
22. **Tanaka Y**, Kato K, Notohara K et al. (2001) Frequent  $\beta$ -catenin mutation and cytoplasmic/nuclear accumulation in pancreatic solid-pseudopapillary neoplasm. *Cancer Res* 61: 8401-8404
23. **Van Diest PJ**, Michaelides RJ, Jannink L, et al. (1997) Cyclin D<sub>1</sub> expression in invasive breast cancer. Correlations and prognostic value. *Am J Pathol*, 150:705-711.
24. **Fernandez V**, Hartmann E, Ott G et al. (2000) Solid-pseudopapillary tumor of the pancreas its origin revisited. *Virchows Arch* 2000, 436: 473-480
25. **Kosmahl M**, Pauser U, Anlauf M, Sipos B, Peters K, Lüttges J, Klöppel G (2005) Zystische Pankreastumoren und ihre Klassifikation. *Pathologe*, 26:22-30

26. **Lambert WC**, Kuo H-R, Lambert MW (1998) Xeroderma pigmentosum and related disorders. Principles of Molecular Medicine (Hrsg. Jameson JP). Humana Press, Totowa, New Jersey
27. **Müller-Höcker J**, Zietz CH, Sendelhofert A (2001) Deregulated expression of cell cycle-associated proteins in solid pseudopapillary tumor of the pancreas. Mod pathol, 14:47-53
28. **28 Tetsu O**, McCormick F (1999)  $\beta$ -Catenin regulates expression of Cyclin D<sub>1</sub> in colon carcinoma cells. Nature, 398:422-426
29. **Sherr CJ**, McCormick F (2002) The RB and p53 pathways in cancer. Cancer Cell, 2:103-12
30. **Barnes DM** (1997) Cyclin D<sub>1</sub> in mammary carcinoma. J Pathol, 181:267-9
31. **Jung SE**, Kim DY, Park KW, Lee SC, Jang JJ, Kim WK (1999) Solid papillary and epithelial neoplasm in the pancreas in children. World J Surg, 23:233-236
32. **Yagi M**, Shiraiwa K, Abiko M, Miura N, Sakuma H, Naito M (1994) A solid and cystic tumor of the pancreas in a 10-year-old girl: report of a case and review of the literature. Surg Today, 24:826-828
33. **Sutherland RL**, Prall OW, Watts CK et al. (1998) Estrogen and progestin regulation of cell cycle progression. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 3:63-72
34. **Groshong SD**, Owen GO, Grimison B et al. (1997) Biphasic regulation of breast cancer cell growth by progesterone: role of the cyclin-dependent kinase inhibitors, p21 and p27 (Kip1). Mol Endocrinol, 11:1593-1607
35. **Said TK**, Conneely OM, Medina D et al. (1997) Progesterone, in addition to estrogen, induces Cyclin D<sub>1</sub> expression in the murine mammary epithelial cell, in vivo. Endocrinology, 138:3933-3939
36. **36 Faivre E**, Skildum A, Peirson-Mullany L et al. (2005) Integration of progesterone receptor mediated rapid signaling and nuclear actions in breast cancer cell models: role of mitogen-activated protein kinases and cell cycle regulators. Steroids, 70:418-426
37. **Walter de Gruyter** (1994) Pschyrembel 257. Auflage
38. **Walker HK**, Hall, WD, Hurst JW (c1990) Clinical Methods: The History, Physical and Laboratory Examinations. Stoneham (MA): Butterworth Publishers, third edition
39. **Gareth I. Owen**, Jennifer K. Richer, Lin Tung, Glenn Takimoto, and Kathryn B. Horwitz (1998) Progesterone Regulates Transcription of the p21WAF1 Cyclin Dependent Kinase Inhibitor Gene through Sp1 and CBP/p300. The Journal Of Biological Chemistry, 273:10696–10701

40. **Gould DC**, Petty R., Jacobs HS (2000) The male menopause – does it exist? Brit Med J, 320:858-861
41. **Schatzl G**, Madersbacher S, Temml C, et al. (2003). Serum androgen levels in men: impact of health status and age. Urology, 61:629-633
42. **W. Weidner**, L. Hertle (2000) Der alternde Mann; Der Urologe, 39:405- 406
43. **43 Krishnamurthy J**, Ramsey MR, Ligon KL, Torrice C, Koh A, Bonner-Weir S, Sharpless NE (2006) p16INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. Nature, 443:453-7
44. **Krishnamurthy J**, Ramsey MR, Ligon KL et al. (2006) p16 INK4a induces an age-dependent decline in islet regenerative potential. Nature, 443:453-457

## 8. Anhang

Tabelle 1

Klinische Daten

(Die Patientenfälle sind als fortlaufende Nummern verschlüsselt)

fortl.Nr./ Jahr	Geschlecht	Alter	Malignität	Lokalisation	Größe Ø (cm)
01/84	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.
02/84	W	28		Pankreas	6x6
03/85	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.
04/86	W	31		Corpus-Schwanzbereich	7
05/86	W	36		Pankreasschwanz	8x7
06/86	W	24		k.A.	17x14x8
07/87	W	21		Pankreasschwanz und Milzhilus	k.A.
08/87	W	32		Pankreaskopf	5x4x3
09/87	W	19	maligne	Pankreasschwanz; Lebermetastasen	13
10/87	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.
11/79	W	31		Pankreaskopf	3x3x2
12/81	W	36		Pankreaskörper	6x4x3
13/84	W	42		Pankreas	k.A.
14/91	k.A.	k.A.		k.A.	k.A.
15/94	W	11		k.A.	k.A.
16/98	W	32		Pankreas	7x7x7
17/98	M	43		Pankreas	k.A.
18/98	k.A.			k.A.	k.A.
19/98	M	12		k.A.	k.A.
20/98	M	12		k.A.	k.A.
21/88	k.A.			k.A.	k.A.
22/00	W	20		Pankreaskopf, Duodenum	k.A.
23/00	W	17		k.A.	k.A.
24/06	W	31		k.A.	2x1x1
25/02	W	29		k.A.	2x1x1
26/88	W	20		Pankreasschwanz-Milzbereich	k.A.
27/88	W	13		Pankreaskopf	6x6x6
28/90	W	27		Pankreasschwanz	k.A.
29/91	W	25		Pankreasschwanz	k.A.
30/90	W	22		k.A.	k.A.
31/90	W	25		extrapankreatischer Tumor	13x11x7
32/91	W	13		k.A.	k.A.
33/91	W	14		k.A.	k.A.
34/92	W	35		Pankreasschwanz	10x9x6

fortl.Nr./ Jahr	Geschlecht	Alter	Malignität	Lokalisation	Größe Ø (cm)
35/02	M	43		k.A.	4
36/93	W	21		Pankreas, Duodenum	8
37/94	W	63		Pankreasschwanz	13
38/94	W	53	potentiell maligne	k.A.	k.A.
39/94	W	34		k.A.	k.A.
40/97	W	21		k.A.	k.A.
41/92	W	52		Pankreaskopf	k.A.
42/80	W	25		Pankreaskopf	k.A.
43/80	W	14		Pankreaskopf	k.A.
44/82	W	27		Pankreaszyste	8x4x3
45/82	k.A.			k.A.	k.A.
46/93	W	62		Pankreasschwanz	5
47/96	W	13		k.A.	k.A.
48/96	W	56		Pankreaskörper	11x9x7
49/96	W	56		Pankreaskörper	10x5x5
50/96	W	26		Pankreaskörper	3x3
51/82	W	27		Pankreaskopf	7x7
52/97	W	31		k.A.	k.A.
53/97	W	16		Pankreasschwanz	6x5x4
54/98	W	32		Pankreas	7x7x7
55/98	W	36		k.A.	k.A.
56/98	W	15		Pankreaskopf	k.A.
57/98	W	42		k.A.	k.A.
58/99	W	19		k.A.	k.A.
59/99	W	18		Pankreaskopf, Duodenum	13x9x8
60/99	W	27		Pankreaskopf, Duodenum	12x13x1
61/99	W	29		k.A.	4x3x3
62/01	W	19		k.A.	k.A.
63/99	W	44		k.A.	k.A.
64/01	W	41		k.A.	4
65/01	M	71		k.A.	7x5x5
66/01	W	26		k.A.	k.A.
67/01	W	53		k.A.	3x2x1
68/02	k.A.			k.A.	k.A.
69/03	W	30		k.A.	11
70/01	W	40		k.A.	5
71/03	W	35		k.A.	6
72/03	M	13		k.A.	4
73/03	W	58		k.A.	3x4x2
74/04	W	26		k.A.	8x8x5



---

fortl.Nr./ Jahr	Geschlecht	Alter	Malignität	Lokalisation	Größe Ø (cm)
75/04	W	17		k.A.	7x6x4
76/04	W	18		k.A.	k.A.
77/04	W	63		k.A.	k.A.
78/04	W	47		k.A.	3
79/05	W	44		Pankreaskopf	4,5
80/05	W	15		k.A.	3x3
81/06	M	65		k.A.	k.A.
82/06	W	37		k.A.	k.A.
83/06	W	19		k.A.	k.A.
84/06	W	29		k.A.	k.A.
85/99	M	15		Pankreaskopf	9x6x5
86/01	M	40		k.A.	12
87/03	W	27		k.A.	7x6
88/85	W	48		k.A.	6x7

Tabelle 2

Prozentuale Verteilung der Markerproteine zwischen den Geschlechtern

männliche Patienten mit SPN

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.Abweichung
p27 %	9	20	95	63,33	26,339
p21 %	8	2	60	16,12	19,283
p16 %	9	0	7	2,00	2,500
Cyclin D1 %	9	10	95	60,00	30,822
ATM %	9	0	98	70,89	29,426

weibliche Patienten mit SPN

	N	Minimum	Maximum	Mittelwert	Std.Abweichung
p27 %	68	0	98	54,51	29,303
p21 %	68	0	55	9,76	11,942
p16 %	66	0	20	2,32	3,500
Cyclin D1 %	66	0	85	41,61	26,344
ATM %	67	0	98	60,85	29,258

Tabelle 3

Durchschnittswerte der Expressionshöhe von p21 in Bezug auf das Alter und Geschlecht der Patienten

weibliche Patienten

<b>Alter</b>	<b>p21 %</b>		<b>Alter</b>	<b>p21 %</b>
63	25		27	0
62	25		27	0
58	55		27	10
56	15		27	0
56	0		26	15
53	25		26	0
53	30		26	2
52	20		25	2
48	0		25	20
47	40		25	7
44	10		25	0
44	2		24	2
43	60		22	10
42	25		21	0
42	20		21	2
41	10		21	0
40	5		20	10
40	20		20	5
37	2		19	15
36	45		19	15
36	25		19	30
35	10		19	2
34	2		18	2
32	5		18	2
32	2		17	5
31	2		17	2
31	7		16	2
31	25		15	20
31	15		15	7
30	7		14	2
29	0		14	0
29	0		13	7
29	2		13	2
28	10		13	5
27	0		11	0

---

Durchschnittswerte der Expressionshöhe von p21 in Bezug auf das Alter und Geschlecht der Patienten

männliche Patienten

Alter	p21 %
71	15
65	20
43	k.A.
43	60
40	20
15	2
13	5
12	2
12	5

Tabelle 4

Immunhistochemisches Profil der SPN des Pankreas (pos.= 1; neg.= 0)

fortl.Nr./ Jahr	p27 %	p27 Intensität	p27 pos/neg	p27 % Gruppe	p21 %	p21 Intensität	p21 pos/neg	p21 % Gruppe
01/84	0	0	0	0	0	0	0	0
02/84	25	1	1	2	10	1	1	1
03/85	50	2	1	3	20	1,5	1	1
04/86	20	1,5	1	1	2	1	0	0
05/86	30	1,5	1	2	0	0	0	0
06/86	25	2	1	2	45	2	1	2
07/87	20	1,5	1	1	2	1	0	0
08/87	15	2	1	1	0	0	0	0
09/87	75	2	1	4	5	1,5	1	1
10/87	40	2,5	1	2	15	2	1	1
11/79	70	3	1	3	20	2	1	1
12/81	65	3	1	3	7	1,5	1	1
13/84	75	2,5	1	4	25	2	1	2
14/91	15	2	1	1	25	1,5	1	2
15/94	90	2,5	1	4	10	2,5	1	1
16/98	25	1,5	1	2	0	0	0	0
17/98	95	3	1	4	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
18/98	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	30	2,5	1	2
19/98	20	1	1	1	2	1	0	0
20/98	50	1,5	1	3	5	1	1	1
21/88	90	3	1	4	25	2	1	2
22/00	50	2	1	3	10	1,5	1	1
23/00	35	1,5	1	2	5	1	1	1
24/06	50	2	1	3	25	2	1	2
25/02	90	2	1	4	0	0	0	0
26/88	50	2	1	3	5	1,5	1	1
27/88	7	2	1	1	0	0	0	0
28/90	80	3	1	4	0	0	0	0
29/91	90	3	1	4	20	2	1	1
30/90	75	2	1	4	10	1	1	1
31/90	0	0	0	0	7	1,5	1	1
32/91	90	2	1	4	7	1	1	1
33/91	40	1,5	1	2	2	1	0	0
34/92	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
35/02	25	2	1	2	60	3	1	3
36/93	95	2,5	1	4	2	2	0	0
37/94	70	2	1	3	25	3	1	2
38/94	85	2	1	4	25	2,5	1	2
39/94	50	1	1	3	2	1	0	0

fortl.Nr./ Jahr	p27 %	p27 Intensität	p27 pos/neg	p27 % Gruppe	p21 %	p21 Intensität	p21 pos/neg	p21 % Gruppe
40/97	95	2	1	4	0	0	0	0
41/92	60	2	1	3	20	1,5	1	1
42/80	65	2,5	1	3	2	1,5	0	0
43/80	5	1	1	1	0	0	0	0
44/82	15	1	1	1	0	0	0	0
45/82	5	1	1	1	2	1	0	0
46/93	98	2,5	1	4	25	2,5	1	1
47/96	2	1	0	0	2	1	0	0
48/96	30	2	1	2	15	2	1	1
49/96	70	2	1	3	0	0	0	0
50/96	90	2	1	4	15	1,5	1	1
51/82	0	0	0	0	0	0	0	0
52/97	80	2,5	1	4	15	1,5	1	1
53/97	20	2	1	1	2	1,5	0	0
54/98	50	2,5	1	3	2	1,5	0	0
55/98	25	2,5	1	2	20	1,5	1	1
56/98	40	2,5	1	2	20	2	1	1
57/98	55	2	1	3	20	2,5	1	1
58/99	50	2,5	1	3	15	1,5	1	1
59/99	2	1	0	0	2	1,5	0	0
60/99	65	3	1	3	10	1,5	1	1
61/99	70	3	1	3	0	0	0	0
62/01	80	3	1	4	30	2	1	2
63/99	75	2,5	1	4	10	2	1	1
64/01	65	2	1	3	10	2	1	1
65/01	85	3	1	4	15	2,5	1	1
66/01	45	2	1	2	0	0	0	0
67/01	70	2,5	1	3	30	2,5	1	2
68/02	90	3	1	4	15	2,5	1	1
69/03	60	2	1	3	7	2	1	1
70/01	90	2,5	1	4	5	2	1	1
71/03	75	2,5	1	4	10	2	1	1
72/03	75	2	1	4	5	2	1	1
73/03	90	2,5	1	4	55	2,5	1	3
74/04	90	2	1	4	2	1,5	0	0
75/04	40	2	1	2	2	1	0	0
76/04	80	3	1	4	2	1	0	0
77/04	35	2	1	2	30	2	1	2
78/04	50	2	1	3	40	1,5	1	2
79/05	80	3	1	4	2	1,5	0	0
80/05	50	2	1	3	7	1	1	1
81/06	80	2,5	1	4	20	2,5	1	1

---

fortl.Nr./ Jahr	p27 %	p27 Intensität	p27 pos/neg	p27 % Gruppe	p21 %	p21 Intensität	p21 pos/neg	p21 % Gruppe
82/06	95	2	1	4	2	2	0	0
83/06	65	2	1	3	2	1,5	0	0
84/06	98	3	1	4	2	1	0	0
85/99	75	2,5	1	4	2	1	0	0
86/01	65	2	1	3	20	1,5	1	1
87/03	55	2,5	1	3	0	0	0	0
88/85	5	1	1	1	0	0	0	0

fortl.Nr./ Jahr	p16 %	p16 Intensität	p16 pos/neg	p16 % Gruppe
01/84	0	0	0	0
02/84	0	0	0	0
03/85	0	0	0	0
04/86	2	2	0	0
05/86	5	2	1	1
06/86	2	1	0	0
07/87	2	1	0	0
08/87	0	0	0	0
09/87	0	0	0	0
10/87	2	2	0	0
11/79	2	1,5	0	0
12/81	2	2	0	0
13/84	0	0	0	0
14/91	2	2	0	0
15/94	5	1	1	1
16/98	2	1	0	0
17/98	0	0	0	0
18/98	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
19/98	2	1	0	0
20/98	2	1,5	0	0
21/88	5	1,5	1	1
22/00	2	2	0	0
23/00	2	1	0	0
24/06	0	0	0	0
25/02	0	0	0	0
26/88	2	2	0	0
27/88	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
28/90	2	2	0	0
29/91	2	1	0	0
30/90	2	1	0	0
31/90	2	1	0	0
32/91	0	0	0	0
33/91	0	0	0	0
34/92	0	0	0	0
35/02	0	0	0	0
36/93	0	0	0	0
37/94	0	0	0	0
38/94	0	0	0	0
39/94	0	0	0	0
40/97	10	2	1	1
41/92	20	2,5	1	1
42/80	0	0	0	0



fortl.Nr./ Jahr	p16 %	p16 Intensität	p16 pos/neg	p16 % Gruppe
43/80	0	0	0	0
44/82	0	0	0	0
45/82	2	2	0	0
46/93	2	1	0	0
47/96	0	0	0	0
48/96	7	2,5	1	1
49/96	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
50/96	0	0	0	0
51/82	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
52/97	0	0	0	0
53/97	5	2	1	1
54/98	0	0	0	0
55/98	2	2,5	0	0
56/98	2	2	0	0
57/98	2	2	0	0
58/99	2	2	0	0
59/99	2	1	0	0
60/99	2	2	0	0
61/99	2	2	0	0
62/01	2	2	0	0
63/99	2	2	0	0
64/01	0	0	0	0
65/01	7	2	1	1
66/01	5	1	1	1
67/01	2	2	0	0
68/02	0	0	0	0
69/03	2	2	0	0
70/01	2	1	0	0
71/03	15	2	1	1
72/03	0	0	0	0
73/03	2	2	0	0
74/04	2	1	0	0
75/04	2	2	0	0
76/04	0	0	0	0
77/04	5	2,5	1	1
78/04	0	0	0	0
79/05	7	2	1	1
80/05	2	2	0	0
81/06	2	1,5	0	0
82/06	0	0	0	0
83/06	2	2	0	0
84/06	10	2	1	1
85/99	0	0	0	0

fortl.Nr./ Jahr	p16 %	p16 Intensität	p16 pos/neg	p16 % Gruppe
86/01	5	1,5	1	1
87/03	2	2	0	0
88/85	5	2	1	1

fortl.Nr./ Jahr	CyclinD1 %	CyclinD1 Intensität	CyclinD1 pos/neg	CyclinD1 % Gruppe
01/84	0	0	0	0
02/84	10	1	1	1
03/85	35	2	1	2
04/86	15	1,5	1	1
05/86	0	0	0	0
06/86	35	2	1	2
07/87	45	3	1	2
08/87	0	0	0	0
09/87	20	1,5	1	1
10/87	40	1,5	1	2
11/79	70	2,5	1	3
12/81	40	1	1	2
13/84	35	2,5	1	2
14/91	30	2,5	1	2
15/94	60	1	1	3
16/98	35	1	1	2
17/98	70	2,5	1	3
18/98	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
19/98	10	1	1	1
20/98	15	1	1	1
21/88	50	2	1	3
22/00	65	2,5	1	3
23/00	10	1	1	1
24/06	65	2	1	3
25/02	75	3	1	4
26/88	50	2	1	3
27/88	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
28/90	80	2,5	1	4
29/91	65	2	1	3
30/90	60	2,5	1	3
31/90	0	0	0	0
32/91	85	1,5	1	4
33/91	45	1,5	1	2
34/92	40	2	1	2
35/02	70	2,5	1	3
36/93	40	2,5	1	2

fortl.Nr./ Jahr	CyclinD1 %	CyclinD1 Intensität	CyclinD1 pos/neg	CyclinD1 % Gruppe
37/94	65	3	1	3
38/94	85	2,5	1	4
39/94	15	1	1	1
40/97	25	1,5	1	1
41/92	60	2	1	3
42/80	20	1,5	1	1
43/80	35	2,5	1	2
44/82	10	1	1	1
45/82	5	1	1	1
46/93	70	3	1	3
47/96	0	0	0	0
48/96	65	2,5	1	3
49/96	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
50/96	85	2,5	1	4
51/82	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
52/97	75	2	1	4
53/97	50	1,5	1	3
54/98	55	1,5	1	3
55/98	20	2	1	1
56/98	40	1,5	1	2
57/98	50	1,5	1	3
58/99	2	1	0	0
59/99	2	1	0	0
60/99	2	1	0	0
61/99	25	1	1	2
62/01	75	2	1	4
63/99	70	2	1	3
64/01	20	1	1	1
65/01	80	2,5	1	4
66/01	30	2	1	2
67/01	75	2,5	1	4
68/02	70	2	1	3
69/03	60	2	1	3
70/01	50	2	1	3
71/03	40	1,5	1	2
72/03	85	1,5	1	4
73/03	75	2,5	1	4
74/04	10	1	1	1
75/04	40	1,5	1	2
76/04	20	2	1	1
77/04	70	2	1	3
78/04	80	2,5	1	4

fortl.Nr./ Jahr	CyclinD1 %	CyclinD1 Intensität	CyclinD1pos/neg	CyclinD1 % Gruppe
79/05	70	2	1	3
80/05	60	2	1	3
81/06	95	3	1	4
82/06	30	1	1	2
83/06	45	2	1	2
84/06	70	2	1	3
85/99	40	1	1	2
86/01	75	1,5	1	4
87/03	5	1	1	1
88/85	0	0	0	0

fortl.Nr./ Jahr	ATM %	ATM Intensität	ATM pos/neg	ATM % Gruppe
01/84	50	1	1	3
02/84	60	1	1	3
03/85	55	2	1	3
04/86	50	1,5	1	3
05/86	35	1	1	2
06/86	0	0	0	0
07/87	70	1,5	1	3
08/87	0	0	0	0
09/87	95	2,5	1	4
10/87	70	1,5	1	3
11/79	70	1,5	1	3
12/81	85	2	1	4
13/84	70	1,5	1	3
14/91	70	1,5	1	3
15/94	35	1	1	2
16/98	35	1	1	2
17/98	0	0	0	0
18/98	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
19/98	60	1	1	3
20/98	90	1	1	4
21/88	80	1	1	4
22/00	50	2	1	3
23/00	85	1,5	1	4
24/06	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
25/02	75	2	1	4
26/88	70	2,5	1	3
27/88	0	0	0	0
28/90	75	1	1	4
29/91	75	2	1	4
30/90	25	1	1	2

fortl.Nr./ Jahr	ATM %	ATM Intensität	ATM pos/neg	ATM % Gruppe
31/90	0	0	0	0
32/91	60	1	1	3
33/91	40	1	1	2
34/92	0	0	0	0
35/02	85	2	1	4
36/93	95	1	1	4
37/94	80	1	1	4
38/94	60	1,5	1	3
39/94	98	1,5	1	4
40/97	45	1	1	2
41/92	60	1,5	1	3
42/80	70	2	1	3
43/80	20	1	1	1
44/82	2	1	0	0
45/82	0	0	0	0
46/93	50	1,5	1	3
47/96	30	2	1	2
48/96	90	2	1	4
49/96	70	2	1	3
50/96	80	1,5	1	4
51/82	k.A.	k.A.	k.A.	k.A.
52/97	70	2	1	3
53/97	90	1	1	4
54/98	40	1	1	2
55/98	60	1,5	1	3
56/98	85	3	1	4
57/98	55	2	1	3
58/99	2	1	0	0
59/99	65	1	1	3
60/99	75	1	1	4
61/99	50	1,5	1	3
62/01	80	2	1	4
63/99	75	1	1	4
64/01	90	2	1	4
65/01	80	1,5	1	4
66/01	35	1	1	2
67/01	85	2	1	4
68/02	95	2,5	1	4
69/03	85	2	1	4
70/01	90	2	1	4
71/03	80	2	1	4
72/03	70	2	1	3

fortl.Nr./ Jahr	ATM %	ATM Intensität	ATM pos/neg	ATM % Gruppe
73/03	75	3	1	4
74/04	85	1	1	4
75/04	95	2	1	4
76/04	65	2,5	1	3
77/04	55	1	1	3
78/04	95	2	1	4
79/05	90	1	1	4
80/05	80	2,5	1	4
81/06	98	2,5	1	4
82/06	65	1,5	1	3
83/06	90	2,5	1	4
84/06	95	3	1	4
85/99	65	1,5	1	3
86/01	90	2	1	4
87/03	45	1,5	1	2
88/85	0	0	0	0

## 8. Danksagung

Frau PD Dr. med. Katharina Tiemann sei für die Vergabe des Themas und die motivierende, herzliche, stets freundliche Unterstützung gedankt.

Bei Herrn Prof. Dr. med. Günther Klöppel möchte ich mich für die Ermöglichung der Durchführung dieser Arbeit am Institut der Pathologie der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel bedanken.

Den medizinisch-technischen Assistentinnen Anja Bredtmann und Maike Pacena möchte ich mich für die immunhistochemischen Färbungen und ausführlichen Erläuterungen der unterschiedlichsten Arbeitsschritte erkenntlich zeigen.

Meinen Dank möchte ich PD Dr. Bence Sipos aussprechen, da ich mich mit Fragen im Zusammenhang mit dem Statistik-Programm an ihn wenden durfte. Außerdem half er mit der medizinisch-technischen Assistentin Sabine Roggenbrodt bei der Herstellung der Micro Tissue Arrays. Auch Ihr sei gedankt.

Ein Dankeschön geht an Herrn Strauss, der im EDV-Bereich die Soft- und Hardware am Laufen hielt und auf den aktuellsten Stand brachte.

Meine Dankbarkeit richtet sich überdies an meine Mutter Petra Grabau, die mich Zeit meines Lebens in vielerlei Hinsicht unterstützt hat sowie meinem Partner Christian Leopold und dessen Mutter Gertrud Leopold. Sie betreuten unter anderem meine kleinen Töchter Diana und Julia Grabau, um mir das Verfassen dieser Dissertation zu ermöglichen.

## 9. Lebenslauf

### Persönliche Daten:

Name: Astrid Karla Bärbel Grabau  
Geburtsdatum: 19.09.1977  
Geburtsort: Hamburg  
Staatsangehörigkeit: deutsch/US-amerikanisch  
Lebenspartner: Christian Otto Lepold (geb.: 24.08.1972)  
Kinder: Diana Maria Sophie Grabau (geb.: 27.04.2007)  
Julia Ingrid Katharina Grabau (geb.: 6.03.2010)

### Schulausbildung:

1997: Abitur am Gymnasium der Moorbekschule in Norderstedt

### Hochschulausbildung:

1998: Studium der Zahnmedizin am Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf  
2004: Studium der Zahnmedizin an der Christian-Albrechts-Universität Kiel  
Juli 2006: Staatsexamen

### Promotion:

seit  
September 2006: Retrospektive, immunhistochemische Studie über solide  
pseudopapilläre Neoplasien des Pankreas.  
  
Durchgeführt am Institut für Allgemeine Pathologie im  
Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel in  
Zusammenarbeit mit Dr. Tiemann. (damaliger Direktor: Prof. Dr. med.  
G. Klöppel)

seit Juni 2008: Beginn der Tätigkeit als Vorbereitungsassistentin